

# **Angiogenese und Knochenstoffwechsel beim multiplen Myelom**

## **HABILITATIONSSCHRIFT**

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Dr. med. Orhan Sezer



Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Eingereicht am: 04.01.2001

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Einsele

2. PD Dr. med. M. R. Mesters

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 17.07.2001

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	4
1.1 Plasmazelldyskrasien: MGUS, AL-Amyloidose, multiples Myelom	4
1.2 Stadieneinteilung und Remissionskriterien des multiplen Myeloms	5
1.3 Therapieverfahren	5
1.4 Angiogenese	7
1.5 Beziehung zwischen der Angiogenese und Knochenresorption	10
1.6 Knochenresorption	10
1.7 Differenzierung zwischen multiplem Myelom und MGUS	13
<b>2 Zielstellung der Arbeit</b>	14
<b>3 Patienten und Methoden</b>	16
3.1 Patienten	16
3.2 Messung der Mikrogefäßdichte (microvessel density, MVD) im Knochenmark	17
3.3 Messung der Zytokinkonzentrationen	22
3.4 Knochenstoffwechselfparameter	23
3.5 Durchflußzytometrie: Immunphänotypisierung und DNA-Analyse	24
3.6 Zytogenetik	25
3.7 Statistik	26
<b>4 Ergebnisse</b>	27
4.1 Infektiöse Komplikationen der Hochdosismotherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation	27
4.2 Prognostische Relevanz der Angiogenese beim multiplen Myelom	36
4.3 Veränderungen der Angiogenese unter Chemotherapie und die prognostische Relevanz dieser Veränderungen für das progressionsfreie Überleben	38
4.4 Korrelation zwischen der Angiogenese und der Plasmazellinfiltration sowie dem Serum $\beta$ 2-Mikroglobulin bei Patienten mit multiplem Myelom	46
4.5 Angiogenetisch wirksame Zytokine in verschiedenen Stadien des multiplen Myeloms	49
4.6 Veränderungen der Zytokinspiegel unter Therapie des multiplen Myeloms	52
4.7 Korrelationen angiogenetisch wirksamer Zytokine beim multiplen Myelom	55
4.8 Prognostische Relevanz der zytogenetischen Veränderungen beim multiplen Myelom	56
4.9 Knochenresorption	61
4.10 Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Differenzierung des multiplen Myeloms und der monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz	69

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
5.1	Infektiöse Komplikationen der Hochdosistherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation	75
5.2	Angiogenese bei malignen Neoplasien	78
5.3	Prognostische Relevanz der Angiogenese für die Überlebenszeit beim multiplen Myelom	81
5.4	Veränderungen der Angiogenese unter Chemotherapie beim multiplen Myelom	82
5.5	Korrelation zwischen der Angiogenese und der Plasmazellinfiltration sowie dem Serum $\beta$ 2-Mikroglobulin	84
5.6	Angiogenetisch wirksame Zytokine beim multiplen Myelom	85
5.7	Möglichkeiten der Beeinflussung der Angiogenese	88
5.8	Knochenresorption beim multiplen Myelom	89
5.9	Möglichkeiten der Reduktion der Knochenresorption beim multiplen Myelom	92
5.10	Zytogenetische Veränderungen beim multiplen Myelom	94
5.11	Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Differenzierung zwischen multiplen Myelom und MGUS	95
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
	Abkürzungen	119
	Eidesstattliche Versicherung	120
	Danksagung	121

## **1. Einleitung**

Das multiple Myelom ist eine Erkrankung monoklonaler B-Lymphozyten mit terminaler Differenzierung (Plasmazellen) und geht in der Regel mit einer diffusen oder multilokulären Infiltration des Knochenmarks einher. Das multiple Myelom umfaßt 10% der hämatologischen Neoplasien und ist somit etwa gleich häufig wie Morbus Hodgkin. Die klinische Symptomatik ist einerseits durch den Einfluß des malignen Plasmazellklons auf den Knochenstoffwechsel mit Stimulation der Osteoklasten, andererseits durch die infektiösen Probleme bei der Immundefizienz geprägt. Knochenschmerzen stellen die häufigsten subjektiven Beschwerden der Patienten dar, Infektionen sind die häufigste Todesursache. Das therapeutische Ziel ist die Verlängerung des Überlebens mit Besserung der Lebensqualität. In Zusammenarbeit mit der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) haben wir speziell für Patienten mit multiplem Myelom einen Fragebogen entwickelt, der zur Evaluation der Lebensqualität der Patienten sowie zur Erfassung der subjektiven Veränderungen der Lebensqualität eingesetzt werden kann (Stead et al. 1999).

### **1.1. Plasmazeldyskrasien: MGUS, AL-Amyloidose, multiples Myelom**

Für die Diagnosestellung des multiplen Myeloms werden am häufigsten die Diagnosekriterien von Durie & Salmon herangezogen, die in den Siebziger Jahren erstellt und 1986 in der heute gültigen Form modifiziert wurden (Durie und Salmon 1975, Durie 1986). Neben diesen Diagnosekriterien existieren weitere publizierte Klassifikationssysteme, um ein multiples Myelom von einer monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) abzugrenzen (Ong et al. 1995). MGUS kann im weiteren Verlauf in ca. 25% der Fälle in ein multiples Myelom übergehen (Kyle 1995). Die Standardtherapie des multiplen Myeloms beginnt bei asymptomatischen Patienten nicht im Frühstadium, sondern im progredienten Stadium II/III. Falls jedoch neue Therapiestrategien entwickelt werden, die eine Intervention im Frühstadium des multiplen Myeloms sinnvoll erscheinen lassen, würde die genaue Abgrenzung zwischen MGUS und Frühstadium eines multiplen Myeloms weiter an Bedeutung gewinnen (s. Kapitel 1.7).

Eine wichtige Manifestation der monoklonalen Gammopathie ist die primäre systemische AL (amyloid light-chain) Amyloidose. Sie ist eine monoklonale Plasmazellerkrankung, bei der die

Einlagerung des Leichtkettenproteins in verschiedenen Organen zu deren progressivem Funktionsverlust führt. Am häufigsten werden die Nieren, das Herz und die Leber befallen (Sezer et al. 2000d). Die Prognose ist mit einer medianen Lebenserwartung von 1 bis 2 Jahren sehr schlecht. Die Chemotherapie mit Melphalan und Prednison kann die mediane Überlebenszeit von 8,5 auf 18 Monate erhöhen (Kyle et al. 1997). Weniger als 30% der Patienten, die mit Melphalan und Prednison behandelt werden, zeigen ein Ansprechen. Mit der Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation steht eine wesentlich wirksamere Therapie zur Verfügung (Sezer et al. 1999d, Sezer et al. 2000f). Aufgrund der Einschränkung der Funktionsreserven verschiedener Organsysteme ist jedoch die therapieassoziierte Mortalität der Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation bei der Amyloidose ungewöhnlich hoch und liegt bei ca. 20% (Comenzo et al. 1998). Neue Therapieansätze sind in Entwicklung (Sezer et al. 2000c, Sezer et al. 2000i).

## **1.2. Stadieneinteilung und Remissionskriterien des multiplen Myeloms**

Die Stadieneinteilung des multiplen Myeloms erfolgt nach Durie und Salmon (Durie und Salmon 1975). Auch wenn in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, daß Parameter wie  $\beta_2$ -Mikroglobulin, S-Phasenanalyse (San Miguel et al. 1995) und Zytogenetik (Seong et al. 1998) die Prognose besser voraussagen als die Stadieneinteilung nach Durie und Salmon, liegt die Bedeutung dieser Einteilung darin, daß sie zur Entscheidung des Beginns einer Chemotherapie herangezogen werden kann, da asymptomatische Patienten im Stadium I nicht von einer zytostatischen Therapie profitieren (Hjorth et al. 1993). Die Remissionskriterien wurden für eine konventionell dosierte Chemotherapie (Chronic Leukemia and Myeloma Task Force 1973) und für die Hochdosistherapie mit hämatopoetischer Stammzelltransplantation (Blade et al. 1998) getrennt publiziert.

## **1.3. Therapieverfahren**

Das progressive multiple Myelom im Stadium II und III erfordert eine Chemotherapie. Das multiple Myelom ist die einzige Krankheit, bei der der Vorteil einer Hochdosischemotherapie (HDCT) im Rahmen der Erstlinienbehandlung bei Patienten unter 60 Jahren gesichert ist. Eine

große randomisierte Studie der französischen Myelomgruppe zeigte bei Patienten im Stadium II/III in dem HDCT-Arm mit autologer Stammzelltransplantation einen deutlichen Überlebensvorteil (Attal et al. 1996). Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug für die Hochdosisgruppe 52%, für die konventionell behandelte Gruppe dagegen lediglich 12%. Alle Patienten unter 60 Jahren, die keine Kontraindikation aufweisen, sollten im Rahmen der Erstlinientherapie einer HDCT zugeführt werden. Dies ist deswegen von besonderer Relevanz, da eine vorgeschaltete etwaige Therapie mit Melphalan eine hohe Stammzelltoxizität aufweist und eine spätere hämatopoetische Stammzellgewinnung erschwert oder verhindert. Es gibt Hinweise, daß die HDCT auch bei einem Alter über 60 Jahren durchgeführt werden kann, wobei die Toxizität der HDCT mit zunehmendem Alter ansteigt. Nach der HDCT entwickeln die Patienten eine schwere Neutropenie und sind durch infektiöse Komplikationen gefährdet. Die Art der Infektionen nach autologer Stammzelltransplantation weicht von der nach allogener Stammzelltransplantation ab und wurde in wenigen Studien mit häufig kleiner Patientenzahl untersucht (Salazar et al. 1999). Einige Autoren haben die Infektionen nach der autologen Knochenmarktransplantation untersucht (Mossad et al. 1996). Da diese Transplantationsform heute weitgehend zurückgedrängt worden ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die determinierenden Faktoren der dokumentierten Infektionen nach HDCT mit autologer peripherer Stammzelltransplantation in einem großen Patientenkollektiv multivariat untersucht (s. Kapitel 4.1). Diese Daten können zu einem besseren Verständnis der therapieassoziierten infektiösen Risiken führen und einer rationalen Entwicklung prophylaktischer Maßnahmen dienlich sein.

Bei Patienten, bei denen sich eine HDCT verbietet, ist Melphalan und Prednison (MP) weiterhin die Standardtherapie (Alexanian et al. 1969). Mit dieser Behandlung erreichen 40% der Patienten eine Remission, die etwa 2 Jahre anhält. Die mediane Überlebenszeit beträgt mit MP für Patienten im Stadium II 40 Monate und für Patienten im Stadium III 23 Monate. Neben der Chemotherapie kommt der supportiven Therapie bei den Patienten mit multiplem Myelom eine hohe Bedeutung zu.

Bei Refraktärität gegenüber Alkylantien ist die Standardtherapie die VAD-Kombination (Barlogie et al. 1984). Sie besteht aus einer Dauerinfusion von Vincristin und Adriamycin

über 96 Stunden sowie einer hochdosierten Dexamethasongabe und zeigt in dieser Situation die höchsten Remissionsraten. Da diese Therapie jedoch einen zentralvenösen Katheter und eine Dauerinfusion über 96 Stunden erforderlich macht, wird an Modifikationen dieses Protokolls gearbeitet, um diese Nachteile zu überwinden (Sezer et al. 1999b).

#### **1.4. Angiogenese**

Als Angiogenese oder Neovaskularisation wird die Neubildung von Gefäßen bezeichnet. Sie findet unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen, wie z.B. beim zyklischen Aufbau der Gebärmutter Schleimhaut, bei der Embryogenese, bei akuten und chronischen inflammatorischen Reaktionen (Fava et al. 1994) oder bei Hypoxie statt (Sakuda et al. 1992) und kann somit einerseits zur Reparatur von ischämischen oder entzündlichen Läsionen, andererseits aber auch zur Gewebszerstörung und Krankheitsausbreitung führen. Die tumorassoziierte Angiogenese bildet eine Grundvoraussetzung für das fortschreitende Wachstum und die Metastasierung von soliden Tumoren (Folkman 1995, Liotta et al. 1991). Als Maß für die Angiogenese dient die Anzahl der Gefäße pro Areal (microvessel density, MVD). Die Gefäße werden mittels immunhistochemischer Färbungen (CD31, CD34, Faktor VIII oder Thrombomodulin) dargestellt (Weidner et al. 1991). Zu den Prozessen, die zur Gefäßneubildung führen, gehören die Migration und Proliferation von Endothelzellen, die Expression proteolytischer Enzyme, der Umbau der extrazellulären Matrix und schließlich der morphologische Prozeß der tubulären Anordnung der Endothelzellen und die Formierung eines neuen Gefäßes. Diese Prozesse stehen *in vivo* unter der Kontrolle verschiedener angiogenetischer bzw. antiangiogenetischer Faktoren, die überwiegend als lösliche Moleküle freigesetzt werden. Sie sind am Ort der Gefäßneubildung, aber auch im peripheren Blut des jeweiligen Patienten meßbar. An der Produktion und Regulation dieser Faktoren sind unter anderem Monozyten/Makrophagen, Mastzellen, Bindegewebszellen, Endothelzellen und auch Tumorzellen beteiligt (Montesano et al. 1992). Es ist jedoch nicht im Einzelnen geklärt, über welche Mechanismen die Aktivierung der genannten Effektorzellen zustande kommt. Eine Gewebshypoxie und die damit assoziierten Produkte des Intermediärstoffwechsels, z.B. der Laktatanstieg und Abfall des pH-Wertes, wie sie im ischämischen, inflammatorischen oder auch in schnell wachsenden Tumorgeweben auftreten, scheinen ein Hauptstimulus für die Freisetzung der angiogenetischen Faktoren zu sein (Plate et al. 1993, Shweiki et al. 1992).

Weitere hypoxieunabhängige Mechanismen sind ebenfalls beteiligt, hier ist vor allem die Aktivierung extrazellulärer Matrixenzyme zu nennen, die unter anderem zur Aktivierung und Freisetzung angiogenetisch wirksamer Moleküle führen. Schließlich können Tumorzellen selbst angiogenetische Faktoren produzieren oder die Zellen in ihrer Umgebung, z.B. die Zellen des Knochenmarkstromas, zur Produktion dieser Faktoren anregen. Die Summe der Veränderungen, die schließlich zur Neubildung von Gefäßen in einem Tumor führt, wird als „angiogenic switch“ bezeichnet (Hanahan und Folkman 1996). Dieses „Einschalten“ des angiogenetischen Prozesses geschieht unabhängig von der malignen Transformation (Folkman und Shing 1992), wobei nicht im Einzelnen geklärt ist, inwieweit die Initiierung der Angiogenese einer Kontrolle durch bestimmte Onkogene oder Tumorsuppressorgene unterliegt (Weinstat-Saslow und Steeg 1994).

Auslöser für den angiogenetischen Prozeß ist ein Ungleichgewicht zwischen den angiogenetischen und antiangiogenetischen Faktoren (Hanahan und Folkman 1996). Wichtige stimulierende angiogenetische Faktoren sind die Zytokine vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) und hepatocyte growth factor (HGF). Sie werden von verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen oder Tumorzellen produziert (Brindle et al. 1993). Die angiogenetische Potenz dieser Peptide wurde in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen charakterisiert. Auch deren Rezeptoren konnten auf Endothelzellen identifiziert werden (Baird und Böhlen 1990). Neben den oben genannten Substanzen gibt es zahlreiche weitere angiogenetisch wirksame Moleküle, vornehmlich aus der Gruppe der Zytokine und Wachstumsfaktoren (Schott und Morrow 1993, Leibovich et al. 1994), aber auch niedermolekulare Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) besitzen eine direkte oder indirekte angiogenetische Potenz. Um die Homöostase der Angiogenese aufrecht zu erhalten, existiert eine große Anzahl endogener antiangiogenetischer Peptide. Dazu gehören Angiostatin (O'Reilly et al. 1994), Thrombospondin (Rastinejad et al. 1989), Somatostatin (Grant et al. 1993), Interferon- $\alpha$  (Ezekowitz et al. 1992) und verschiedene Enzyme der extrazellulären Matrix (Johnson et al. 1994). Die Vielzahl der bereits identifizierten endogenen Stimulatoren und Inhibitoren läßt bereits die Komplexität der Regulation des Angiogenesemechanismus erkennen. Wie sich die Interaktion dieser Faktoren unter physiologischen und pathologischen Bedingungen *in vivo* abspielt, ist nur teilweise untersucht. So ist nicht definitiv geklärt, ob die Tumorangiogenese



durch genotypische oder phänotypische Veränderungen maligner Zellen initiiert wird oder ob der durch das Größenwachstum des Tumors entstehende Sauerstoff- und Nährstoffmangel einen wesentlichen indirekten angiogenetischen Reiz darstellt (Battegay et al. 1995).

Die klinische Bedeutung dieser Vorgänge als Schlüsselprozeß für das Wachstum und Fortschreiten von soliden Tumoren kann allerdings als gesichert gelten. Morphologische Untersuchungen der Tumorgefäßdichte beim Mammakarzinom haben eine Korrelation mit der Metastasierung (Weidner et al. 1991) sowie eine prognostische Relevanz der Angiogenese für das Überleben der Patienten gezeigt (Horak et al. 1992, Gasparini et al. 1994). Ähnliche Beobachtungen wurden beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, beim Prostatakarzinom (Wakui et al. 1992), bei HNO-Tumoren (Craft und Harris 1994) und beim malignen Melanom (Graham et al. 1994) publiziert. Auch für einzelne angiogenetische Faktoren, wie z.B. für VEGF (Salven et al. 1997), bFGF (Nguyen et al. 1994, Brattström et al. 1998) und HGF (Taniguchi et al. 1995) konnte bereits gezeigt werden, daß sie bei Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren gegenüber Normalpersonen erhöht sind und in fortgeschrittenen Ausbreitungsstadien weiter ansteigen. Aufgrund dieser Ergebnisse gibt es begründete Hoffnung, daß die Messung angiogenetischer Faktoren im Blut oder im Urin das Ausmaß der Neovaskularisierung anzeigt und somit Einblicke in die angiogenetische Aktivität und den Ausbreitungsgrad liefert und zur Beurteilung des Therapieerfolges herangezogen werden könnte (Nguyen et al. 1994).

Seitdem man die Angiogenese als zentrales pathophysiologisches Prinzip beim malignen Wachstum erkannt hat, sind die Bemühungen zur Hemmung dieses Vorgangs zu einem Schwerpunkt in der Entwicklung neuer Therapiestrategien geworden. Als synthetische Angiogeneseinhibitoren wurden unter anderen das Fumagillin Derivat TNP-470 (Oliver et al. 1994) und Thalidomid (D'Amato et al. 1994) beschrieben. In Tiermodellen konnte das Tumorstadium mit antiangiogenetischen Substanzen (Fotsis et al. 1994) oder durch die Blockade endogener angiogenetischer Faktoren (Kim et al. 1993, Millauer et al. 1994) unterdrückt werden. Beim Menschen wurde eine antiangiogenetische Therapie mit Interferon- $\alpha$  bei kindlichen Hämangiomen erfolgreich angewandt, wodurch eine deutliche Reduktion der Tumormasse erreicht werden konnte (White et al. 1991). In einer weiteren Therapiestudie mit

Interferon- $\alpha$  bei kindlichen Hämangiomen konnte außerdem ein signifikanter Abfall der bFGF Spiegel im Urin der Patienten parallel zum Rückgang des Tumors beobachtet werden (Chang et al. 1997). Bei malignen Tumoren ist die antiangiogenetische Therapie von besonderem Interesse, da davon auszugehen ist, daß die genetische Instabilität des Tumors, die letztlich zur Zytostatikaresistenz führt, sich nicht in dem Maße auf die antiangiogenetische Therapie auswirken würde, wenn diese auf die genetisch stabilen Endothelzellen zielt (Folkman 1995). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß eine Kombination von konventionellen Zytostatika mit Angiogeneseinhibitoren zu einer synergistischen antineoplastischen Wirkung führt (Teicher et al. 1993). Zusammenfassend erscheint die Angiogenese als pathophysiologisches Prinzip des Tumorwachstums von großer Bedeutung und die Hemmung der Angiogenese könnte eine attraktive Therapiestrategie in der Behandlung maligner Erkrankungen darstellen.

### **1.5. Beziehung zwischen der Angiogenese und Knochenresorption**

Angiogenese ist für das Wachstum, die Entwicklung und Modifikation von Geweben erforderlich. Im Knochen geht das Auftreten von Osteoklasten mit einer Gefäßinvasion einher. Die Koinzidenz von Knochenresorption und der Neubildung von Kapillaren findet sich sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen wie bei Knochenmetastasen, so daß vermutet wird, daß diese beiden Prozesse gemeinsame Modulatoren aufweisen (Pluijm et al. 2000). Nach Zellkontakt mit Myelomzellen setzen Osteoblasten IL-6 frei, das zu einer Stimulation der Osteoklastenaktivität führt (Bataille 1995, Karadag et al. 2000). Es wurde gezeigt, daß IL-6 in vitro die VEGF Produktion der Myelomzellen stimuliert (Dankbar et al. 2000). In einem in vitro Modell isolierter Osteoklasten führte VEGF zu einer Zunahme der Knochenresorption (Nakagawa et al. 2000). Diese Befunde lassen eine Beziehung zwischen der Angiogenese und Knochenresorption möglich erscheinen. Darüber hinaus wird vermutet, daß auch die FGF- und HGF-Produktion maligner Zellen zu einer Stimulation der Osteoklasten führt (Hjertner et al. 1999).

### **1.6. Knochenresorption**

Die lokale Produktion von Zytokinen durch Tumorzellen und durch Zellen des Knochenstromas, die zu einer Stimulation von Osteoklasten führt, ist das Schlüsselereignis bei

der Entstehung von Knochenläsionen bei Krebspatienten. Da Knochenmetastasen häufig zu Schmerzen, pathologischen Frakturen, zu Rückenmarkskompression oder Hyperkalzämie führen, beeinflussen sie die Lebensqualität der Patienten erheblich. Die erhöhte Knochenresorption ist eines der wichtigsten pathophysiologischen Phänomene beim multiplen Myelom. Nur wenige Myelompatienten entwickeln keine Osteolysen (Kyle 1975). Die Osteolysen stehen im weiteren Krankheitsverlauf für die Patienten wegen der damit verbundenen Schmerzen und Frakturen im Vordergrund. Eine Rückbildung der Osteolysen durch die Therapie gelingt selten. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer frühzeitigen Intervention gegen den Knochenabbau. Mit Bisphosphonaten bietet sich die Möglichkeit, die Osteoklastenaktivität, die beim multiplen Myelom bereits in den Frühstadien erhöht ist, zu hemmen. Der Wert einer begleitenden Bisphosphonattherapie ist bei Patienten, die wegen eines multiplen Myeloms chemotherapiert werden, gesichert. Die pathophysiologischen Erkenntnisse legen nahe, daß Bisphosphonate auch im Frühstadium des multiplen Myeloms eine Wirksamkeit gegen Knochenveränderungen entfalten (Sezer et al. 1999c). Eine von uns geleitete randomisierte Studie der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom untersucht, ob mit einer Bisphosphonattherapie die Progression der Krankheit verzögert werden kann.

### **Knochenstoffwechselparameter ICTP, DPD und NTx**

Etwa  $\frac{3}{4}$  der Patienten mit einem multiplen Myelom haben zum Zeitpunkt der Diagnose bereits osteolytische Läsionen, eine diffuse Osteopenie oder beides und weitere entwickeln solche Veränderungen im späteren Krankheitsverlauf. Histomorphologische Untersuchungen am Knochengewebe von Patienten mit multiplem Myelom haben gezeigt, daß ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Knochenresorption und der Aktivität der Erkrankung besteht (Bataille 1995). Die Standardmethode zur Evaluation der Knochenbeteiligung ist beim multiplen Myelom nach wie vor die konventionelle Röntgenuntersuchung des Skeletts. Sie kann durch die Magnetresonanztomographie ergänzt werden, die zusätzliche Informationen, vor allem bei der Differentialdiagnose zwischen osteoporotischen und myelombedingten Knochenveränderungen, liefert. Diese aufwendigen bildgebenden Untersuchungsmethoden sind jedoch insbesondere in frühen Krankheitsstadien in ihrer Sensitivität begrenzt, zumal bereits gezeigt werden konnte, daß die Knochenabbauprozesse beim multiplen Myelom bereits lange aktiv sind, bevor radiologische Veränderungen sichtbar werden oder klinische Symptome auftreten (Bataille et al. 1990). Auch die Beurteilung der Krankheitsaktivität im

Bereich der Knochenresorption ist mit bildgebenden Verfahren nach einer Chemotherapie nur bedingt möglich, da sich einmal aufgetretene Osteolysen nur selten zurückbilden. Hinzu kommt, daß die Knochenmanifestation auch nach intensiver Chemotherapie weiter fortschreiten kann, ohne daß dies an den hämatologischen oder üblichen klinisch-chemischen Parametern der Krankheitsaktivität erkennbar wird (Thornton et al. 1996). Wegen der insgesamt eingeschränkten Aussagefähigkeit der bildgebenden Verfahren in Bezug auf die momentane Aktivität des multiplen Myeloms im Knochengewebe, wären zuverlässige Parameter der Knochenresorption von großem Wert. Als Parameter der Osteoblastenaktivität gelten das Osteocalcin, das carboxyterminale Propeptid des Typ I Prokollagens (PICP) und die knochenspezifische alkalische Phosphatase (Risteli & Risteli 1993). Parameter der Osteoklastenaktivität sind die Knochenabbauprodukte Desoxypyridinolin (Dpd) und das aminoterminal Kollagen Typ I Telozeptid (NTx) sowie das carboxyterminale quervernetzte Typ I Kollagen Telozeptid (ICTP).

Für einige dieser Parameter konnte bereits eine klinische Bedeutung bei malignen Erkrankungen mit Knochenbeteiligung gezeigt werden. Für Osteocalcin wurde eine inverse Beziehung zwischen Serumspiegel und Stadium des multiplen Myeloms gefunden (Carlson et al. 1992). Für ICTP wurde eine Korrelation mit dem Ausmaß der histomorphologisch bestimmten Knochenresorption gezeigt (Eriksen et al. 1993). Beide Parameter, Osteocalcin und ICTP besitzen prognostische Bedeutung beim multiplen Myelom (Carlson et al. 1992, Abildgaard et al. 1997). DPD im Urin scheint ebenfalls mit dem Ausmaß der Knochenresorption zu korrelieren (Bettica et al. 1992), im Urin von Myelompatienten war DPD signifikant gegenüber einem Normalkollektiv erhöht (Pecherstorfer et al. 1997). Auch das Kollagenabbauprodukt NTx zeigt eine Korrelation zu histomorphologischen Zeichen der Knochenresorption (Abildgaard et al. 2000). Um die prognostische Wertigkeit der Knochenstoffwechselparameter bei Myelompatienten weiter zu evaluieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Knochenabbauprodukte ICTP, DPD und NTx sowie die Parameter der Osteoblastentätigkeit, Osteocalcin und knochenspezifische alkalische Phosphatase, bei Patienten mit multiplem Myelom in verschiedenen Stadien der Erkrankung und bei Individuen mit MGUS analysiert. Zusätzlich wurden  $\beta$ 2-Mikroglobulin und das CRP als etablierte Parameter der Krankheitsaktivität evaluiert. Diese Parameter besitzen eine prognostische Bedeutung beim multiplen Myelom, sind jedoch nicht Bestandteil der Durie & Salmon

Klassifikation. Es wurde ebenfalls untersucht, welche prognostische Wertigkeit die Parameter der Knochenresorption für das Überleben aufweisen.

### **1.7. Differenzierung zwischen multiplem Myelom und MGUS**

MGUS und das multiple Myelom sind die häufigsten Formen der monoklonalen Gammopathien. MGUS tritt bei etwa 1% der Bevölkerung über 50 Jahren und in bis zu 10% der über 75-Jährigen auf (Kyle 1995). Individuen mit MGUS entwickeln in etwa 25% der Fälle ein multiples Myelom. Für die Differentialdiagnose zwischen MGUS und multiplem Myelom existieren verschiedene Klassifikationssysteme, die auf einer Kombination von klinischen Kriterien basieren, wie z.B. dem Ausmaß der Knochenmarkinfiltration durch Plasmazellen, der Konzentration monoklonaler Immunglobuline im Serum oder dem Vorhandensein von Osteolysen. Die am häufigsten verwendeten Systeme sind die nach Durie & Salmon, Kyle & Greipp sowie der British Columbia Cancer Agency. Diese Systeme kommen jedoch lediglich in 2/3 der Fälle zu einer identischen Diagnose bezüglich des multiplen Myeloms oder der MGUS (Ong et al. 1995). Die Differentialdiagnose anhand der Kombination verschiedener klinischer Parameter ist daher mit einem gewissen Grad an Unsicherheit verbunden und eine sichere Unterscheidung ist manchmal nur durch eine Verlaufsbeobachtung möglich. Zusätzliche Informationen über zelluläre Charakteristika von Plasmazellen, die durchflußzytometrisch analysiert werden können, könnten deshalb von Nutzen sein. Eine Kombination von Oberflächenantikörpern ermöglicht die Identifizierung von Plasmazellen im Knochenmark und im peripheren Blut. Plasmazellen exprimieren an der Zelloberfläche stark CD38 (++) (Kawano 1993 et al.). Im Knochenmark können die Plasmazellen als CD38++/CD138+ (Synonym für CD138: Syndecan, B-B4) positive Zellen identifiziert werden (Van Zaanen et al. 1995, Wijdenes et al. 1996). Im peripheren Blut können abnorme Plasmazellen als CD38++ und CD45-negative oder nur schwach (dim) CD45 exprimierende Zellen identifiziert werden (Witzig et al. 1996, Rawstron et al. 1997, Schneider et al. 1997). In einem Teilprojekt wurde die Frage untersucht, ob durchflußzytometrische Charakteristika von Plasmazellen für die Differenzierung zwischen MGUS und multiplem Myelom genutzt werden können, da eine sicherere Abgrenzung zukünftig weiter an Bedeutung gewinnen kann, wenn Therapieoptionen im Frühstadium des multiplen Myeloms zur Verfügung stehen.

## **2. Zielstellung der Arbeit**

Die pathophysiologische Bedeutung der Angiogenese bei malignen Erkrankungen wurde bei soliden Tumoren entdeckt. Aktuelle Publikationen geben jedoch Hinweise darauf, daß die Angiogenese nicht, wie früher angenommen, auf solide Tumoren beschränkt ist, sondern auch bei hämatologischen Neoplasien bedeutsam sein könnte. Das Hauptziel der hier dargestellten Arbeit ist die Klärung der prognostischen Relevanz der Angiogenese bei Patienten mit multiplem Myelom. Zusätzlich zu der Messung der Angiogenese durch immunhistochemische Verfahren in Knochenmarkbiopsaten sollen auch die Konzentrationen angiogenetisch wirksamer Zytokine sowie die Veränderungen dieser Parameter unter systemischer Therapie analysiert werden. Durch diese Untersuchungen soll geklärt werden, welchen Einfluß die systemische Chemotherapie auf die Angiogenese bei Myelompatienten hat. Darüber hinaus soll die Analyse der Angiogenese und der Zytokinspiegel in verschiedenen Stadien der Erkrankung Hinweise für zukünftige Ansätze einer gezielten antiangiogenetischen Therapie liefern.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung verschiedener Parameter der Knochenresorption und deren prognostischer Relevanz beim multiplen Myelom. Diese Analysen sollen dazu beitragen, daß während einer bundesweiten Studie der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom (Leitung: Dr. Sezer & Prof. Dr. Freund), die den Wert einer innovativen Therapiestrategie zur frühzeitigen Hemmung der Knochenresorption beim multiplen Myelom untersucht, die Veränderungen der Knochenresorption adäquat erfaßt werden können.

Nebenaspekte dieser Arbeit befassen sich darüber hinausgehend mit anderen aktuellen Problemen: Unter den Standardtherapien ist die Hochdosistherapie die wirksamste Therapieform des multiplen Myeloms. In einer Multivarianzanalyse mit 600 Zyklen Hochdosistherapie werden multivariat die determinierenden Faktoren für die dokumentierten Infektionen untersucht. Ein Teilaspekt der Arbeit beschäftigt sich mit zytogenetischen Veränderungen beim multiplen Myelom. Des weiteren wird untersucht, ob mit Methoden der durchflußzytometrischen Immunphänotypisierung und DNA-Analyse die Unterscheidung

zwischen monoklonaler Gammopathie unbestimmter Signifikanz und multiple Myelom gelingt, da diese Trennung für innovative Therapiestrategien, die zukünftig im Frühstadium des multiplen Myeloms eingesetzt werden könnten, an Bedeutung gewinnen kann.

Ein Teil der in dieser Arbeit beschriebenen Daten wurde bereits in internationalen peer-reviewed Zeitschriften publiziert oder befindet sich im Druck. Ebenso wurde ein Teil der Daten auf internationalen Kongressen, zuletzt auf der Tagung der American Society of Hematology im Dezember 2000 präsentiert.

Die Darstellung erfolgt als Monographie ergänzt durch publizierte Forschungsergebnisse entsprechend der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin vom 29.1.1999.



### **3. Patienten und Methoden**

#### **3.1. Patienten**

Für die Diagnose des multiplen Myeloms wurden die Southwest Oncology Group (SWOG) Diagnosekriterien in der heute gültigen, modifizierten Form herangezogen (Durie 1986). Die Stadieneinteilung erfolgte nach Durie & Salmon (Durie und Salmon 1975). Das Ansprechen auf konventionell-dosierte Chemotherapie wurde nach den Kriterien der Chronic Leukemia and Myeloma Task Force ermittelt (Chronic Leukemia and Myeloma Task Force 1973). Eine Remission lag demnach vor, wenn mindestens eins der folgenden Kriterien erfüllt war: 1. Reduktion des M-Proteins im Serum um mindestens 50% der Werte vor der Therapie. 2. Abfall des M-Proteins im Urin auf 50% oder weniger der Ausgangswerte, falls der Betrag größer als 1g/24h war oder ein Abfall auf weniger als 0,1g/24h erreicht wurde, sofern die Ausgangswerte zwischen 0,5 und 1g/24h lagen. Das M-Protein im Urin wurde nicht als Indikator für das Ansprechen verwandt, falls die Werte vor der Therapie unter 0,5g/24h lagen. 3. Eine Reduktion von mindestens 50% des Produkts der zwei im Durchmesser größten palpablen oder radiologisch erkennbaren Myelom-Manifestationen. 4. Radiologisch erkennbarer Rückgang der Osteolysen. Dabei darf keine gleichzeitige Progression innerhalb eines der anderen Kriterien auftreten. Das Ansprechen der mit Hochdosischemotherapie und autologer Stammzelltransplantation behandelten Patienten wurde nach den EBMT-Kriterien beurteilt (Blade et al. 1998).

Um die Häufigkeit, Art und Risikofaktoren für Infektionen nach der Hochdosistherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation zu evaluieren, wurden 600 HDCT-Zyklen mit anschließender autologer peripherer Stammzelltransplantation, die bei 490 erwachsenen Patienten durchgeführt wurden, retrospektiv untersucht. Die Erfassung aller Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn C. Bauhuis. Berücksichtigt wurden die ersten 30 Tage nach der Transplantation. Die HDCT wurde zwischen 1993 und 1999 in einer der folgenden vier Kliniken durchgeführt: Universitätsklinikum Charité, Campus Mitte, Städtische Kliniken Oldenburg (OA Dr. B. Metzner, Prof. Dr. H.J. Illiger), Evang. Krankenhaus Essen-Werden (OA Dr. M. Wattad, Prof. Dr. W. Heit) und Humaine Klinikum Bad Saarow (OA Dr. H. Fuss, PD Dr. W. Schulze). Die Patienten wurden mindestens einmal am Tag routinemäßig



untersucht und die Körpertemperatur wurde mindestens dreimal täglich kontrolliert. Bei Auftreten von Fieber wurden Blutkulturen peripher und aus dem zentralvenösen Katheter entnommen. Zusätzliche Abstriche oder Kulturen wurden von klinisch infektionsverdächtigen Bereichen entnommen. Es wurden eine körperliche Untersuchung und eine Röntgenaufnahme des Thorax durchgeführt. Neutropenische Patienten wurden beim Auftreten von Fieber nach publizierten, internationalen Richtlinien mit Breitbandantibiotika behandelt (Hughes et al. 1997). Die Neutropenie wurde als eine absolute Neutrophilenzahl unter 500/ $\mu$ l definiert. Unter klinisch dokumentierten Infektionen wurde Fieber, begleitet durch klinische Infektionssymptome wie Lungeninfiltrate, Haut- oder Weichteilentzündung, perianale Infektion, Harnwegsinfektion oder Sinusitis, verstanden (Link et al. 1994). Mikrobiologisch dokumentierte Infektionen wurden als Fieber, begleitet von mindestens einer positiven Blutkultur oder einer Kultur aus normalerweise sterilen Körperflüssigkeiten, definiert. Für den Nachweis einer Infektion durch Koagulase-negative Staphylokokken oder Corynebakterien wurden mindestens zwei getrennte positive Kulturen gefordert (Link et al. 1994). Clostridium-difficile Enterokolitis wurde bei Patienten mit Diarrhoe und positivem Clostridium-difficile Toxinnachweis diagnostiziert. Fieber ohne klinischen und mikrobiologischen Nachweis einer Infektion wurde als Fieber unklarer Genese klassifiziert (fever of unknown origin, FUO). Infektionen und Komplikationen innerhalb der ersten 30 Tage nach der Transplantation wurden analysiert.

Patientenkollektive, die für andere Fragestellungen herangezogen wurden, wurden ausschließlich im Universitätsklinikum Charité behandelt. Die Charakteristika der Patienten in den einzelnen Teilprojekten werden wegen der besseren Übersicht im Ergebnisteil der jeweiligen Teilprojekte zusammengefaßt. Die Teilprojekte, deren Ergebnisse in dieser Arbeit dargestellt werden, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, so daß die Patientenkollektive unterschiedlich sind. Die Röntgen- und MRT-Untersuchungen erfolgten im Institut für Radiologie der Charité Campus Mitte (Direktor: Prof. Dr. B. Hamm).

### **3.2. Messung der MVD**

Paraffin-eingebettete Knochenmarkbiopsien von adulten Patienten mit multiplem Myelom

wurden untersucht. Die Knochenmarkbiopsien wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die Identifizierung von Kapillaren wurde in dieser Arbeit durchgehend eine immunhistochemische Färbung mittels eines CD34-Antikörpers angewandt. In Voruntersuchungen fanden wir in Übereinstimmung mit Pruneri et al. (Pruneri et al. 1999), der die Angiogenese bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen untersuchte, daß die besten immunhistochemischen Resultate mit einem monoklonalen anti-CD34-Antikörper zu erzielen waren, der vorwiegend an Endothelzellen und nur in geringer Zahl an CD34 exprimierenden hämatopoetischen Zellen (Blasten) bindet. Die Kapillaren waren durch ihre Morphologie klar erkennbar und von den Knochenmarkzellen zu unterscheiden. Im Unterschied zu der Immunhistochemie mit dem anti-CD34-Antikörper, wurden Antikörper, die gegen CD31 bzw. FaktorVIII gerichtet waren, von einer großen Zahl von hämatopoetischen Zellen einschließlich Megakaryozyten und myeloischen Zellen exprimiert, so daß eine exakte Messung der MVD mit diesen Antikörpern weniger praktikabel erschien.

### **Dekalzifizierung der Knochenmarkbiopsien und Immunhistochemie**

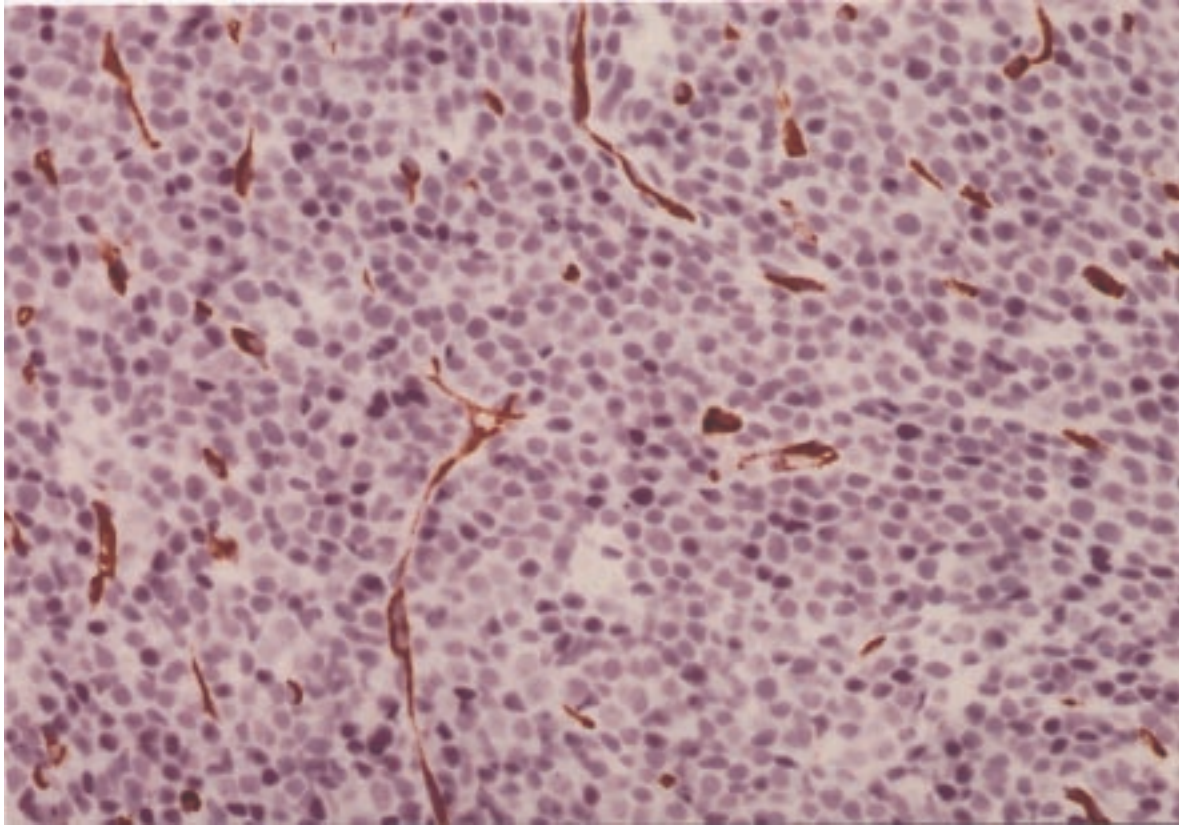
Die Knochenmarkbiopsien wurden in einer Lösung von 10%igem Formalin (Sigma Chemie, Deisenhofen) mit 10% (10g/100ml) Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA, Merck, Darmstadt, Germany) dekalzifiziert. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE), Giemsa, Perjodsäure-Schiff-Reagenz (PAS) und mit der Gomori-Färbung für die Darstellung von Retikulin-Fasern gefärbt.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit Hilfe der Bindung von Streptavidin und Biotin (LSAB-Methode). Die Immunhistochemie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. O. Kaufmann (Institut für Pathologie der Charité, Direktor: Prof. Dr. M. Dietel). Die deparaffinisierten und rehydrierten 3-5 µm dicken Schnitte wurden mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in destilliertem Wasser für 15 Minuten inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Zur Wiederherstellung der Antigenität wurden die Schnitte unter Druck in 0,1 M Natrium-Citrat-Puffer, pH 6,0 erhitzt. Im Anschluß erfolgte eine 15-minütige Blockade der Präparate mit 10%igem Ziegenserum in TBS (tris-buffered saline) und die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper QBEnd10 gegen CD34 (DAKO, Hamburg) bei einer Verdünnung von 1:50 für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der biotinylierte Sekundärantikörper sowie das Streptavidin/Peroxidase-Konjugat wurden anschließend nach den Anleitungen des Herstellers

(Super Sensitive System, BioGenex, San Ramon, CA) zugefügt. Durch 10-minütiges Eintauchen der Schnitte in eine AEC-Substrat-Fertiglösung (DAKO, Hamburg) konnte das farbige Präzipitat hergestellt werden. Nach Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin erfolgte der Überzug der Schnitte mit Glycerol-Gelatine.

### **Mikroskopie**

Die Messung der MVD erfolgte in Übereinstimmung mit der Methode nach Weidner et al. (Weidner et al. 1991). Die Auszählung der Kapillaren erfolgte an einem zweiköpfigen Lichtmikroskop (Leitz DMRB, D-Wetzlar) simultan durch zwei Untersucher in verblindeter Form in Zusammenarbeit mit Frau K. Niemöller. Die Präparate wurden bei 100facher Vergrößerung betrachtet und bei 250facher Vergrößerung wurden jeweils drei Areale mit hoher Kapillardichte („hot spots“) identifiziert. Bei 400facher Vergrößerung erfolgte in jedem dieser Areale die Auszählung der Kapillaren. Ein 10x15 mm großes Raster wurde in das Okular eingelegt und formierte ein Referenzareal von 0,375 mm<sup>2</sup> bei 400facher Vergrößerung. Bei jedem Präparat fand die MVD-Messung in 9±3 Referenzarealen innerhalb der hot spots statt. Die MVD konnte als Kapillaren pro mm<sup>2</sup> angegeben werden. Kapillaren wurden als Endothelzellgruppen identifiziert. Die Kapillaren konnten klar voneinander abgegrenzt werden, und die Auszählung erfolgte sowohl bei vorhandenem Lumen als auch ohne, wobei das Lumen einen Durchmesser von 10µm nicht übersteigen sollte. Die Abbildungen 1–3 stellen die anti-CD34-gefärbten Knochenmarkschnitte mit einer hohen (1, 2) und einer niedrigen (3) Gefäßdichte dar.



**Abbildung 1.**

**Abbildung 1–3.**

Mit anti-CD34 immunhistochemisch gefärbte Knochenbiopsate von Patienten mit multiple Myelom. Oben in Abb. 1 ist bei 250facher Vergrößerung eine hohe Vaskularisation mit vielen dünnen, spreitenden und sich schlängelnden Gefäßen, mit oder ohne sichtbare Lumina dargestellt. Auf der nächsten Seite ist in Abb. 2 dasselbe Präparat mit hoher MVD bei 400facher Vergrößerung präsentiert. Abb. 3 demonstriert eine niedrige MVD bei einem anderen Patienten bei ebenfalls 400facher Vergrößerung.



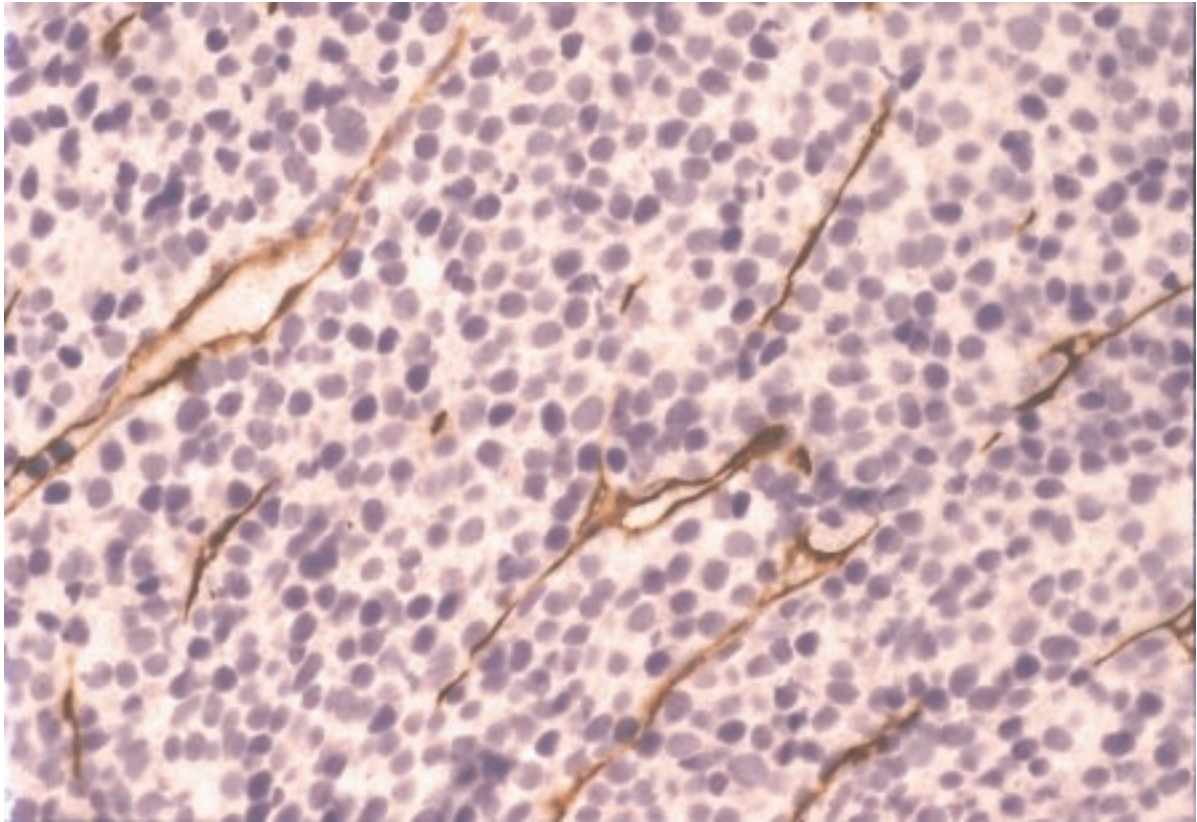


Abbildung 2.

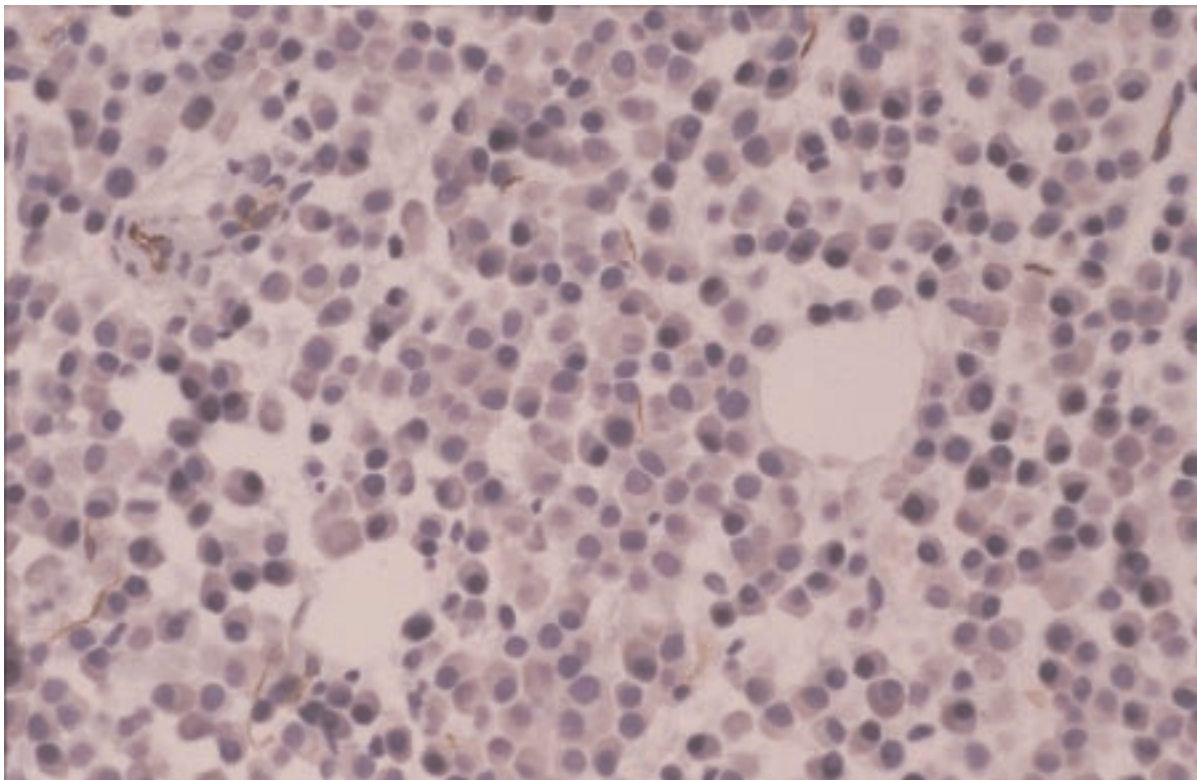


Abbildung 3.

Zur Beurteilung der MVD subtrahierten einige Autoren die Summe der Areale jedes Feldes, welche durch Fett überlagert waren und bezeichneten diese Messung als „optimierte“ MVD, welche gegenüber der herkömmlichen Methode allerdings keinen Vorteil erbrachte (Rajkumar et al. 1999b). In dieser Arbeit wurde deswegen auf diese Modifikation verzichtet. Die Variabilität zwischen den drei Arealen der maximalen MVD, den hot spots, betrug 3,7% bei den Präparaten vor der Behandlung und 4,2% bei denen nach der Therapie. Um die Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit angewandten Technik zu evaluieren, wiederholten wir nach 3 Monaten die Messung der MVD der Knochenmarkbiopsate in der selben Art wie oben beschrieben. Die mittlere absolute Differenz zwischen der ersten und der zweiten Messung betrug 6% des Mittelwertes der beiden Messungen, die Standardabweichung war 4%.

### **3.3. Messung der Zytokinkonzentrationen**

Für diese Untersuchungen wurden Serum und Plasmaproben von Personen mit MGUS (n=11) und Patienten mit multiplen Myelom (n=56) sowie von gesunden Blutspendern (n=20) asserviert. Das periphere Blut wurde sofort nach der Blutabnahme verarbeitet und zunächst bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert. Die zentrifugierten Blutproben wurden umgehend in mehreren Aliquots eingefroren und bis zur Messung bei -76°C aufbewahrt. Ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurde vermieden, um einen proteolytischen Abbau der Zytokine auszuschließen. Für die Analyse des Einflusses der Chemotherapie auf den Zytokinspiegel wurden die Proben unmittelbar vor Beginn der Chemotherapie und nach Beendigung der Behandlung entnommen. Patienten, die eine Strahlentherapie erhielten, wurden nicht eingeschlossen.

Die Bestimmung der Zytokinspiegel im Serum erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn C. Jakob und Frau F. Gatz mittels eines Sandwich-ELISA unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen bFGF, VEGF, HGF und IL-6 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). Die Detektion der Immunreaktion erfolgte für VEGF, HGF und IL-6 mit Meerrettich Peroxidase als Enzymsystem, und für bFGF durch ein hochempfindliches System mit alkalischer Phosphatase, das einen zusätzlichen Amplifikationsschritt beinhaltet. Standards und Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung gemessen, die Intra- und Interassay-Varianz lag jeweils

innerhalb der vom Hersteller angegebenen Bereiche. Die Nachweisgrenzen lagen für bFGF bei 1 bis 64 pg/ml für den hochempfindlichen Assay und bei 9,97 bis 640 pg/ml für den konventionellen Assay, für VEGF bei 31,2 bis 2000 pg/ml, für HGF bei 125 bis 8000 pg/ml und für IL-6 bei 3,12 bis 300 pg/ml.

### **3.4. Knochenstoffwechselparameter**

Es wurden Serum- und Urinproben von insgesamt 72 Patienten mit MGUS (n=12) oder multiplem Myelom in den Stadien I-III (n=60) untersucht. Patienten im Stadium I (n=19) waren unvorbehandelt, die Patienten in Stadium II und III (n=41) befanden sich vor einer Chemotherapie. Die Blutproben wurden bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert und das Serum bis zur Messung bei -76°C asserviert.

NTx wurde aus dem Urin mittels eines kompetitiven Enzymimmunoassays (Elitest NTx, Ostex Inc., Seattle, USA) mit monoklonalen Antikörpern gegen das aminoterminalen Telopeptid des Typ I Kollagens bestimmt. Die Referenzbereiche für NTx lagen bei 89–637 nmol/g Kreatinin für Männer und bei 44–575 nmol/g Kreatinin für Frauen vor der Menopause, die obere Normgrenze für postmenopausale Frauen liegt bei 1150 nmol/g Kreatinin (Sone et al. 1995). DPD wurde ebenfalls aus dem Urin mit einem kompetitiven Enzymimmunoassay (Pyrilinks-D, DPC Corp., Los Angeles, USA) mit monoklonalen anti-DPD-Antikörpern bestimmt. Dieser Assay erfaßt die freie DPD-Konzentration mit einer Spezifität von 100%, die Kreuzreaktivität mit dem peptidgebundenen DPD beträgt weniger als 2,5%. Der Referenzbereich für DPD lag für gesunde männliche Normalpersonen bei 20–48 nmol/g Kreatinin und für weibliche Personen vor der Menopause bei 27–66 nmol/g Kreatinin. NTx und DPD-Werte im Urin sind von der Urinproduktion abhängig, so daß die Meßwerte in nmol/l auf die Kreatininausscheidung als Parameter der Urinkonzentration bezogen werden. Das ICTP wurde mittels eines kompetitiven Radioimmunoassays (Orion Diagnostika, Espoo, Finland) mit I<sup>125</sup>-markierten monoklonalen Antikörpern gegen ICTP bestimmt. Die Referenzbereiche für gesunde Normalpersonen lagen bei 1,6–5,0 µg/l für weibliche und bei 1,3–5,2 µg/l für männliche Personen. Die Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn C. Jakob. Die Erfassung von klinisch-chemischen Routineparametern erfolgte im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der

Charité (Direktor: Prof. Dr. med. E. Köttgen) in Zusammenarbeit mit Frau Dr. B. Brux und Herrn PD Dr. Dr. P. Sinha.

### **3.5. Durchflußzytometrie: Immunphäotypisierung und DNA-Analyse**

#### **Immunphäotypisierung**

Knochenmarkaspirate und Proben von peripherem Blut, die mit EDTA antikoaguliert wurden, wurden innerhalb von 8 Stunden analysiert. Die Durchflußzytometrie wurde mit einer Dreifarbmarkierung unter Verwendung folgender Antikörper durchgeführt: CD19 FITC, CD56 FITC, CD56 PE, CD38 PE (Becton Dickinson, San Jose, CA), CD19 RPE-Cy5, CD45 RPE-Cy5 (DAKO, Glostrup, DK), CD138 FITC (B-B4) (Serotec, Oxford, UK), Kappa-FITC und Lambda-FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA). Für die Oberflächenmarkierung wurden je 10 µl eines FITC-, PE- und RPE-Cy5 konjugierten Antikörpers zu 100 µl der Probe ( $0.5-1 \times 10^6$  Zellen/ml) zugesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Erythrozyten mittels Ortho-mune (Ortho-Clinical Diagnostics, Neckargmund, Germany) durch Ammoniumchlorid lysiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen in PBS gewaschen und am FACSort Durchflußzytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) mit Hilfe der Cellquest-Software analysiert. 50.000 Zellen jeder Probe wurden gemessen. Plasmazellen im Knochenmark wurden als CD38++ und CD138 (B-B4) positive Zellen identifiziert. Im peripheren Blut wurden die CD38++/CD45- Zellen als abnorme Plasmazellen definiert. Diese Zellen wurden bereits als monoklonale Zellen publiziert (Schneider et al. 1997). Die Validierung des monoklonalen Ursprungs in unserem Testsystem wurde durch die intrazelluläre Leichtkettenrestriktion durchgeführt. Dafür wurden die Proben zweimal in PBS gewaschen und anschließend die Erythrozyten lysiert. Nach der Markierung mit Oberflächenantikörpern wurden die Proben zuerst mit Lösung A des Fix & Perm Kits (Caltag Laboratories, San Francisco, CA) und danach mit Lösung B und FITC-konjugierten anti- $\kappa$  oder anti- $\lambda$  Antikörpern inkubiert. Monoklonalität wurde als eine  $\kappa/\lambda$ -Ratio  $\geq 5$  oder  $\leq 0,5$  definiert (Rawstron et al. 1997). Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Frau U. Heider durchgeführt.



### **Zellzyklusanalyse und Ploidie**

Eine DNA-Analyse der Plasmazellen im Knochenmark wurde durchgeführt, um den Anteil der Plasmazellen in der S-Phase sowie den DNA-Gehalt der Plasmazellen zu untersuchen. Dies erfolgte mit Hilfe der Doppelfärbung für Oberflächenantigene und Propidiumiodid (PI) nach der Methode von Vindelov in der nach Orfao modifizierten Form (Orfao et al. 1994, San Miguel et al. 1995b). Es wurden 100 µl des Knochenmarkaspirats mit 10 µl des unmarkierten anti-Maus-CD38 Antikörpers (Immunotech, Marseille, France) oder anti-Maus-CD138 für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal in PBS gewaschen und anschließend mit 10 µl eines FITC-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers (Becton Dickinson) für weitere 15 Minuten inkubiert. Nach der Lyse der Erythrozyten mittels Ammoniumchlorid-Lyse, Waschen und Resuspendieren der Zellen in 100 µl PBS wurden 300 µl der Lösung I (100 mg/l RNase, 3,4 mM Trisodiumcitrat, 0,1% Igepal, 1,5 mM Spermintetrahydrochlorid, 0,5 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan) zugefügt. Nach 10 Minuten wurden 300 µl der Lösung II (208 mg/l Propidiumiodid, 3,4 mM Trisodiumcitrat, 0,1% Igepal, 1,5 mM Spermintetrahydrochlorid, 0,5 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan) zugefügt und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach an einem FACSort Durchflußzytometer im CellFit-Programm analysiert. Zuerst wurden 10.000 Zellen der Gesamtzellpopulation analysiert, im Anschluß daran 10.000 Plasmazellen im sog. Lifegate. Plasmazellen wurden anhand ihrer CD38++ oder CD138 Expression identifiziert. Beides führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Der Prozentsatz an Plasmazellen in der S-Phase wurde mittels des CellFit-Software-Programms unter Nutzung des RFIT-Modells ermittelt.

### **3.6. Zytogenetik**

Die zytogenetischen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. G. Thiel, Institut für Medizinische Genetik der Charité, nach Standardmethoden durchgeführt. Für die FISH Untersuchungen wurden zwei FISH-Sonden, 13q14 zur Detektion einer Deletion des *RB-1*-Lokus und 17p13.1 zur Detektion einer Deletion des *p53*-Lokus (Vysis, Bergisch-Gladbach), verwendet. Das verwendete Protokoll folgte im wesentlichen der von Vysis empfohlenen Prozedur. Es wurde eine Hybridisierungslösung aus jeweils 1µl der beiden Vysis-Sonden, 7µl LSI-Puffer und 1µl H<sub>2</sub>O hergestellt. 5-8µl dieser Hybridisierungslösung

wurden auf den Objektträger des zu untersuchenden Falls aufgebracht, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet. Nach kurzem Antrocknen der Gummilösung wurden die Präparate in einem Metallkasten für 10 min bei 75°C denaturiert und anschließend bei 37°C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Gummilösung entfernt und die Objektträger 3 x 5 min in 4 x SSC/0,1% Tween 20 gewaschen. Nach kurzem Spülen wurden die Präparate im Dunkeln luftgetrocknet. Die Gegenfärbung erfolgte anschließend mit DAPI-Antifade.

### **3.7. Statistik**

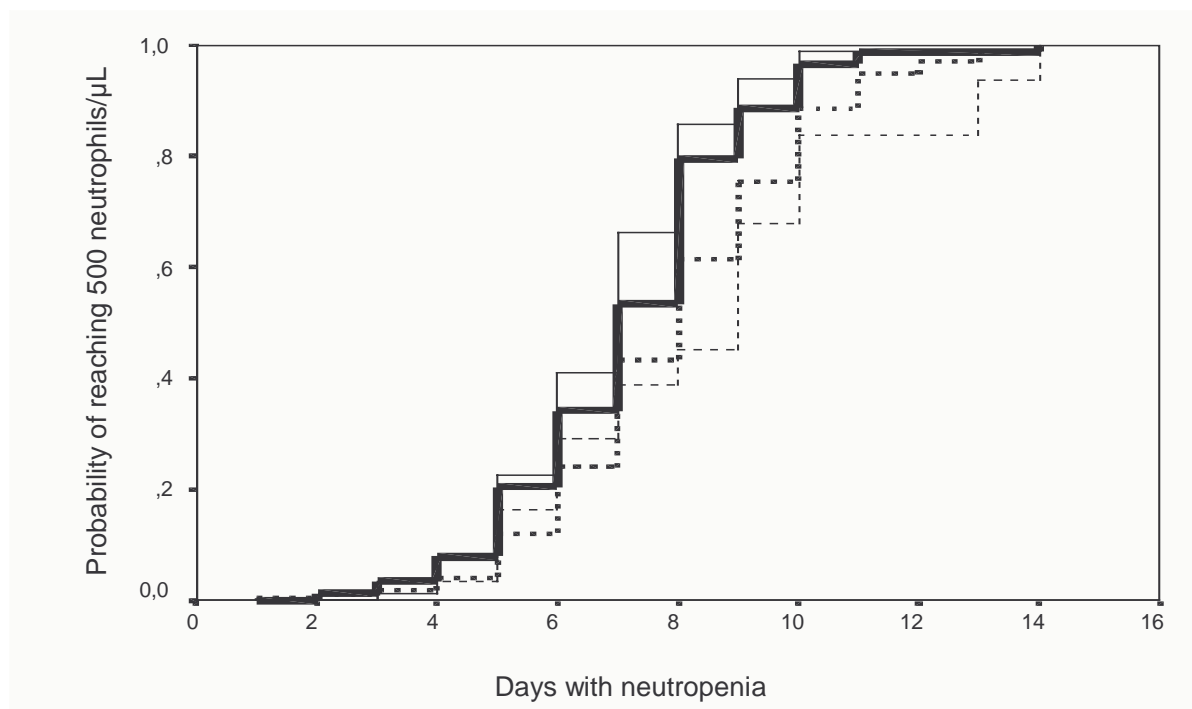
Zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurden die nicht-parametrischen Tests  $\chi^2$ -Test sowie Mann-Whitney U-Test verwendet. Für mehrere unabhängige Stichproben wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt. Für den Vergleich von gebundenen Stichproben wurde der nicht-parametrische Test nach Wilcoxon herangezogen. Korrelationen wurden mit dem Spearman-Rank-Test berechnet. Die Berechnung der medianen Überlebenszeit erfolgte nach der Kaplan-Meier Methode. Die Überlebenszeit wurde vom Zeitpunkt der Probenabnahme (z.B. Knochenmarkbiopsie bei der Analyse des prognostischen Wertes der Angiogenese im Knochenmark) bzw. Intervention bis zum Tod des Patienten berechnet. Die univariate Überlebensanalyse erfolgte mittels des Log-Rank Tests. Für die Analyse der Einflußfaktoren für Infektionen nach der HDCT wurden das Lebensalter zum Zeitpunkt der HDCT und die Zahl der transplantierten CD34+ Zellen/kg als kontinuierliche Variablen; Geschlecht, Grundkrankheit, Positiv- oder Negativselektion des Transplantats, Einsatz der HDCT innerhalb der Erstlinientherapie oder nach Auftreten eines Rezidivs, Ganzkörperbestrahlung, Dosis der G-CSF-Gabe nach der autologen Stammzelltransplantation und Medikamente zur antimikrobiellen Prophylaxe als kategoriale Faktoren in der Multivarianzanalyse berücksichtigt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Infektiöse Komplikationen der Hochdosischemotherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation

Da die Hochdosischemotherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation beim multiplen Myelom die effektivste Therapieform unter den Standardtherapien darstellt, aber mit dem Risiko von Infektionen in der Phase der Knochenmarkaplasie verbunden ist, wurde in einem Teilprojekt untersucht, welche Faktoren mit dem Auftreten von dokumentierten Infektionen nach der Hochdosistherapie vergesellschaftet sind.

Zunächst wurde der Einfluß der transplantierten Stammzellen auf die Dauer der Neutropenie (ANC, absolute Neutrophilenzahl  $< 500/\mu\text{l}$ ) in 559 Zyklen HDCT mit autologer peripherer Stammzelltransplantation bei Patienten mit Lymphomen und soliden Tumoren untersucht. Patienten, die mit  $5,0 - 8,0 \times 10^6 \text{ CD34}^+$  Zellen/kg autolog transplantiert wurden, zeigten eine signifikant schnellere Rekonstitution der Neutrophilenzahlen als die beiden Patientengruppen, die weniger als  $2,0 \times 10^6 \text{ CD34}^+$  Zellen/kg (log-rank Test,  $P < 0,005$ ) bzw.  $2,0 - 5,0 \times 10^6 \text{ CD34}^+$  Zellen/kg ( $P < 0,005$ ) erhielten. Eine weitere Steigerung der transplantierten Stammzellmenge ( $\geq 8,0 \times 10^6 \text{ CD34}^+$  Zellen/kg) führte im Vergleich zu der Gruppe der mit  $5 - 8 \times 10^6$  Stammzellen/kg transplantierten Patienten nicht zu einer weiteren Verkürzung der Dauer der Neutropenie. Die absolute Dauer der Neutropenie in verschiedenen Gruppen von Patienten, die mit unterschiedlicher Stammzellzahl transplantiert wurden, sind in der Abbildung 4 dargestellt, die 95% Konfidenzintervalle sind in der Tabelle 1 angegeben. Die Daten zeigen, daß eine optimale Stammzellzahl bezüglich der Dauer der Neutropenie bei  $\geq 5 \times 10^6/\text{kg}$  liegt (Sezer et al. 2000k).



**Abbildung 4.**

Kaplan-Meier Kurven der Dauer der Neutropenie nach Hochdosischemotherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation als eine Funktion der Stammzellmenge. Dünne durchgezogene Linie:  $\geq 8 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg, dicke durchgezogene Linie:  $< 8$  aber  $\geq 5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg, dicke gestrichelte Linie  $< 5$  aber  $\geq 2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg, dünne gestrichelte Linie  $< 2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg.

**Tabelle 1.**

Absolute Dauer der Neutropenie nach der Hochdosischemotherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation (ANC  $< 500/\mu\text{L}$ ). CI: Konfidenzintervall.

CD34 <sup>+</sup> (x 10 <sup>6</sup> /kg)	95% CI
< 2	14 d
$\geq 2$ - < 5	12 d
$\geq 5$ - < 8	10 d
$\geq 8$	10 d

In einem zweiten Schritt wurden neben der Zahl der CD34<sup>+</sup> Zellen/kg eine Reihe weiterer Einflußfaktoren auf die Rate der dokumentierten Infektionen nach einer HDCT mit autologer peripherer Stammzelltransplantation univariat und multivariat in einem großen Kollektiv erstmals untersucht. Demographische Charakteristika der 600 HDCT Zyklen sind in der Tabelle 2 angegeben. Das mediane Alter der Patienten betrug 46 Jahre, die Spannweite 18-72. Alle Patienten, die mit HDCT und Stammzelltransplantation behandelt wurden, entwickelten eine Neutropenie  $< 0.5 \times 10^9/l$  mit einem medianen Nadir von  $\leq 0.1 \times 10^9/l$ . Febrile Neutropenie und dokumentierte Infektionen traten in 80,5% bzw. 29% der HDCT Zyklen auf. Die Rate der dokumentierten Infektionen in verschiedenen Subgruppen von Patienten sind in der Tabelle 3 wiedergegeben. In der univariaten Analyse waren die Art der Grundkrankheit (Krankheitskategorien Leukämien vs. Lymphome einschließlich multiples Myelom vs. solide Tumoren), Alter, Geschlecht und Positivselektion des Transplantates Risikofaktoren, die signifikant mit der Entwicklung von dokumentierten Infektionen nach der HDCT assoziiert waren (Tabelle 4). Als Nächstes wurde eine multivariate Analyse durchgeführt, in die alle Variablen, die in der Tabelle 4 aufgeführt sind, eingebracht wurden. In der multivariaten Analyse waren die Art der Grundkrankheit, Alter und die Zahl der transplantierten Stammzellen unabhängige Faktoren, die mit einem erhöhten Risiko des Auftretens dokumentierter Infektionen vergesellschaftet waren (Tabelle 5).

Die Rate sowohl der mikrobiologisch dokumentierten als auch der klinisch dokumentierten Infektionen war in den drei Krankheitskategorien signifikant unterschiedlich (Tabelle 6). Mikrobiologisch dokumentierte Infektionen traten in 25,5% und klinisch dokumentierte Infektionen in 10,8% der HDCT Zyklen auf. Bakteriämie war mit 77% die häufigste Form aller dokumentierten Infektionen nach HDCT mit autologer Stammzelltransplantation. Gram-positive Erreger machten 82% unter den mikrobiologisch gesicherten Infektionen aus. Gesicherte invasive Pilzinfektionen, virale Infektionen oder *Pneumocystis carinii* Infektionen traten im Gegensatz zu der allogenen Stammzelltransplantation selten auf und machten weniger als 5% aller dokumentierten Infektionen aus.

**Tabelle 2.**

Charakteristika der Hochdosischemotherapie und der Empfänger der autologen Stammzelltransplantation

Charakteristikum	Zahl	%
Zahl der HDCT Zyklen	600	100
Geschlecht		
weiblich	300	50
männlich	300	50
Alter Median	46	
≤40	221	36,8
41-50	157	26,2
51-60	197	32,8
>60	25	4,2
Diagnose		
Hämatologische Neoplasien	360	60,0
- Multiples Myelom	116	19,3
- Non-Hodgkin Lymphome	163	27,2
- Morbus Hodgkin	40	6,7
- Leukämien	41	6,8
Solide Tumoren	240	40,0
- Mammakarzinom	144	24,0
- Keimzelltumoren	55	9,2
- Andere solide Tumoren	41	6,8
Zeitpunkt der HDCT		
Im Rahmen der Erstlinientherapie	333	55,5
Als Rezidivtherapie	267	44,5
Ganzkörperbestrahlung	52	8,7
Stammzellzahl (CD34 <sup>+</sup> x10 <sup>6</sup> Zellen/kg) Median	3,8	
<5 x10 <sup>6</sup> /kg	403	67,2
≥5 x10 <sup>6</sup> /kg	197	32,8
Purging		
Positiv-Purging	207	34,5
Negativ-Purging	4	0,7
G-CSF Dosis nach der Transplantation		
keine	70	11,7
5 µg/kg	461	76,8
10 µg/kg	69	11,5
Antimikrobielle Prophylaxe		
Chinolone	520	86,7
Trimethoprim-sulfamethoxazol	80	13,2
Amphotericin B p.o.	570	95,0
Fluconazol	324	54,0
Itraconazol	121	20,2
Immunoglobuline	294	49,0

**Tabelle 3.**

Rate der dokumentierten Infektionen in verschiedenen Patientensubgruppen

Charakteristikum		Rate der dokumentierten Infektionen (%)
Gesamt:		29,0
Geschlecht:	weiblich	24,3
	männlich	33,7
Alter:	≤40	21,7
	41-50	27,4
	51-60	38,1
	>60	32,0
Diagnose:	Hämatologische Neoplasien	35,8
	- Multiples Myelom / Lymphom	34,5
	- Leukämie	46,3
	Solide Tumoren	18,8
Zeitpunkt der HDCT:	Im Rahmen der Erstlinientherapie	28,8
	Als Rezidivtherapie	29,2
Ganzkörperbestrahlung:	ja	32,7
	nein	28,6
CD 34+ Zellzahl:	<5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/kg	30,5
	≥5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/kg	25,9
Positiv-Purging:	ja	34,3
	nein	26,2
Negativ-Purging:	ja	25,0
	nein	29,0
G-CSF Gabe nach der Transplantation:		
	keine	28,6
	5 µg/kg	30,4
	10 µg/kg	20,3
Antimikrobielle Prophylaxe:		
Chinolone:	ja	28,8
	nein	30,0
Cotrimoxazol:	Ja	21,3
	nein	30,2
Amphotericin B p.o.:	Ja	28,6
	nein	36,7
Fluconazol:	ja	27,5
	nein	30,8
Itraconazol:	ja	28,9
	nein	29,0
Immunoglobuline:	ja	31,6
	nein	26,5

**Tabelle 4.**

Univariate Analyse der Risikofaktoren für dokumentierte Infektionen

Charakteristikum	<i>P</i>
Leukämie vs. Myelom/Lymphom vs. solider Tumor	<0,0005
Alter	<0,0005
Geschlecht	0,015
Positiv-Purging	0,047
G-CSF Dosis nach der Transplantation	0,107
Stammzellzahl / kg	0,324
Ganzkörperbestrahlung	0,526
Zeitpunkt der HDCT	0,928
Negativ-Purging	1,000
Antimikrobielle Prophylaxe	
Cotrimoxazol	0,113
Immunoglobuline	0,177
Amphotericin B p.o.	0,409
Fluconazol	0,417
Chinolone	0,895
Itraconazol	1,000

**Tabelle 5.**

Multivariate Analyse der Risikofaktoren für dokumentierte Infektionen

Charakteristikum	<i>P</i>
Leukämie vs. Myelom/Lymphom vs. solider Tumor	0,0014
Alter	0,0197
Stammzellzahl / kg	0,0455



**Tabelle 6.**

Neutropenisches Fieber und dokumentierte Infektionen nach HDCT in verschiedenen Krankheitsgruppen

	Leukämien	Multiples Myelom / Lymphome	Solide Tumoren	<i>P</i> -Wert
Febrile Neutropenie	92,7 %	80,3 %	78,8 %	0,114
Dokumentierte Infektionen	46,3 %	34,5 %	18,8 %	<0,0005
- mikrobiologisch dokumentiert	39,0 %	28,8 %	18,8 %	0,003
- klinisch dokumentiert	22,0 %	14,7 %	3,8 %	<0,0005

Die HDCT kann schwere Einschränkungen der Mukosafunktion und -regeneration im gesamten Gastrointestinaltrakt hervorrufen. Sie tritt bei mehr als 50% der Patienten nach der HDCT auf. Die Mukositis stellt sich einerseits aus der Sicht des Patienten als eine besondere Belastung dar, andererseits kann die Mukosa ihre Funktion als Barriere gegen stets präsente pathogene Mikroorganismen der Gastrointestinalflora nicht mehr aufrechterhalten. Deswegen analysierten wir in einer Serie von 592 HDCT-Zyklen mit autologer peripherer Stammzelltransplantation bei 484 erwachsenen Patienten Faktoren, die mit der Mukositis assoziiert waren sowie den Einfluß der Mukositis auf die Rate dokumentierter Infektionen und auf die therapieassoziierte Mortalität. Da der Einsatz der bekannten Mukositis-Scores nicht unproblematisch ist (Peterson 1999), verwendeten wir in dieser Studie die Dauer der aufgrund der Mukositis notwendigen parenteralen Morphintherapie (DPM) als Surrogatmarker für die Dauer der schweren Mukositis (Sezer et al. 2000e).

Die mediane DPM betrug 5,0 Tage (Range: 0-31 Tage, Mittelwert 5,6). Die Grunderkrankung (Leukämien, Lymphome/Myelome oder solide Tumoren), Ganzkörperbestrahlung und Neutropeniedauer, jedoch nicht das Alter, waren signifikante Faktoren für die DPM in der univariaten Analyse (Tabelle 7). Wurden diese Parameter in eine

multivariate Analyse eingesetzt, so war die Neutropeniedauer der einzige signifikante Faktor ( $P < 0,05$ ) für die DPM. Bei 269 HDCT-Zyklen dauerte die DPM weniger als 5 Tage. Wenn die DPM  $\geq 5$  Tage betrug, traten dokumentierte Infektionen im Vergleich zu einer DPM von unter 5 Tagen etwa doppelt so häufig auf. Bei einem Cut-off-Wert für die DPM von  $\geq 5$  Tagen zeigte sich eine hochsignifikante Assoziation der DPM nicht nur mit mikrobiologisch und klinisch dokumentierten Infektionen ( $P < 0,0005$ ), sondern auch mit der therapieassoziierten Mortalität nach HDCT mit autologer PBSCT ( $P < 0,05$ , Tabelle 8).

**Tabelle 7.**

Univariate Analyse zur Dauer der parenteralen Morphintherapie

Kovariate	Median	<i>P</i>
Diagnose		0,031
Leukämie	8	
Lymphom / Myelom	6	
Solide Tumoren	5	
Hochdosistherapie-Protokoll		0,013
mit TBI	8	
hne TBI	5	
Altersverteilung		0,497
18-20	9	
21-30	4	
31-40	5	
41-50	6	
51-60	5	
> 60	6	
Dauer der Neutropenie (Tage bis ANC 500)		0,002
$\leq 10$	5	
$> 10$	8	

**Tabelle 8.**

Beziehungen zwischen der Dauer der parenteralen Morphintherapie (DPM) und klinisch oder mikrobiologisch dokumentierten Infektionen sowie therapieassoziierter Mortalität nach Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation

	Mikrobiologisch dokumentierte Infektionen				
	Ja		Nein		
	n	%	n	%	<i>P</i>
DPM, Tage					< 0,0005
< 5	222	82,5	47	17,5	
≥ 5	219	67,8	104	32,2	
	Mikrobiologisch oder klinisch dokumentierte Infektionen				
DPM, Tage					< 0,0005
< 5	213	79,2	56	20,8	
≥ 5	208	64,4	115	35,6	
	Therapieassoziierte Mortalität				
DPM, Tage					0,034
< 5	269	100	0	0	
≥ 5	317	98,1	6	1,9	

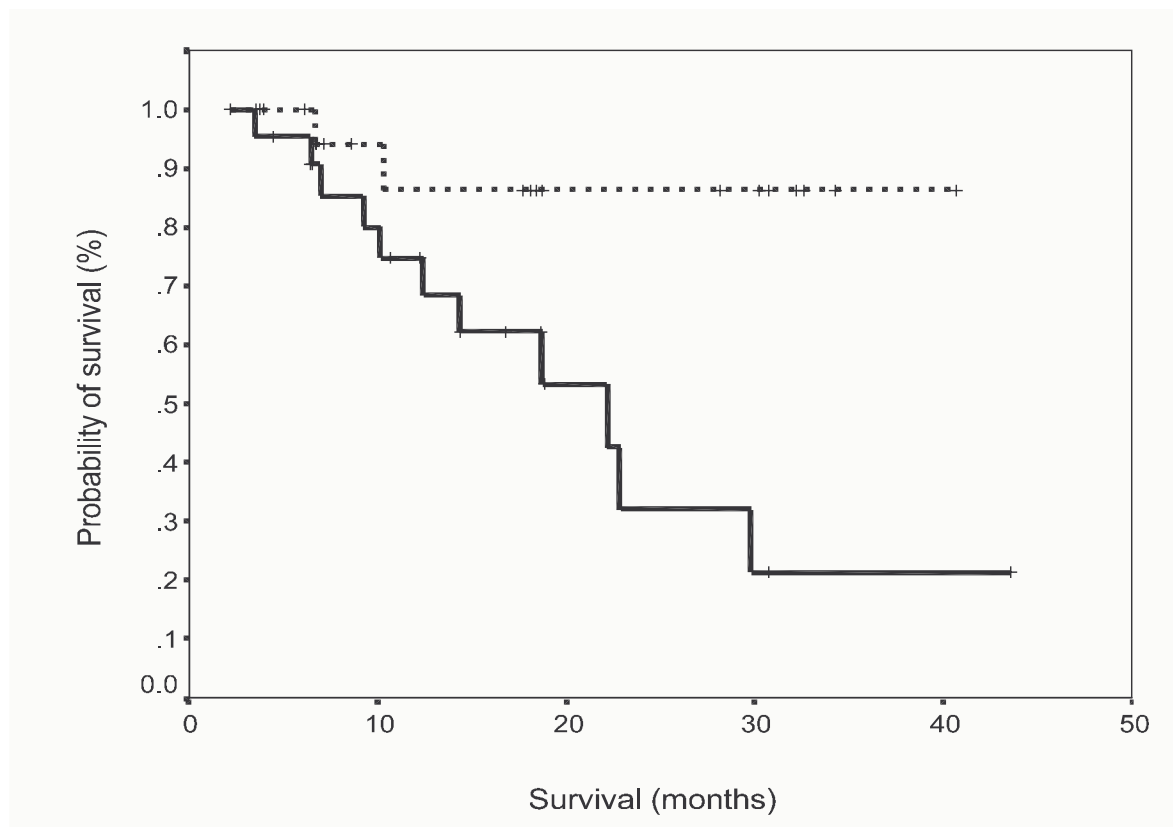
#### 4.2. Prognostische Relevanz der Angiogenese beim multiplen Myelom

Das Kollektiv für diese Untersuchung bestand aus 44 Patienten mit multiplem Myelom (16 Patienten im Stadium I, 3 im Stadium II und 25 Patienten im Stadium III). Das mediane Alter betrug 63 Jahre (34-87 Jahre), 17 Patienten waren weiblich und 27 männlich. Alle eingeschlossenen Patienten wiesen ein neu diagnostiziertes multiples Myelom auf und waren somit zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion unvorbehandelt. Während des weiteren Krankheitsverlaufs im Beobachtungszeitraum wurden 32 der Patienten chemotherapiert. Dabei wurden 23 Patienten mit einer konventionellen Chemotherapie und 9 Patienten mit einer Hochdosischemotherapie und anschließender autologer peripherer Stammzelltransplantation (PBSCT) behandelt. In dieser Untersuchung wurde die krankheitsbezogene Überlebenszeit herangezogen. Nur ein Patient verstarb an einer anderen Erkrankung als an dem multiplen Myelom (plötzlicher Herztod bei koronarangiographisch gesicherter koronarer Herzkrankheit, ohne Myelom-assoziierte Hyperviskosität). Die mediane MVD betrug 48 Kapillaren/mm<sup>2</sup> (Bereich 0-125/mm<sup>2</sup>). Das Kollektiv wurde durch den Medianwert der MVD als cut-off in zwei Gruppen mit einer hohen und einer niedrigen MVD dichotomisiert. Die Überlebenskurven nach der Kaplan-Meier-Analyse sind in Abbildung 5 dargestellt (Sezer et al. 2000h).

Das mediane Überleben der Patienten mit hoher MVD betrug 22 Monate, während in der Gruppe mit niedriger MVD die mediane Überlebenszeit nicht erreicht wurde ( $P<0,01$ ). Bei der Analyse der Untergruppe der 23 Patienten, die im weiteren Verlauf der Beobachtung eine konventionelle Chemotherapie erhielten, zeigte sich eine mediane Überlebenszeit von 10 Monaten bei hoher MVD, die mediane Überlebenszeit wurde bei Patienten mit niedriger MVD wiederum nicht erreicht ( $P<0,03$ ).

Zusätzlich wurde der prognostische Wert der MVD im Knochenmark in einer multivariaten Analyse mittels des Cox-Regressionsmodells untersucht. Dabei wurden die Spiegel von  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2-MG) und C-reaktivem Protein (CRP), das IL-6 abhängig in der Leber gebildet wird, berücksichtigt, da bereits von Bataille et al. die prognostische Relevanz dieser beiden Parameter gezeigt wurde (Bataille et al. 1992). Zusätzlich zu den Parametern in seinem Model (dichotomisierte Werte mit den Grenzwerten von 6 mg/l für  $\beta$ 2-MG und 0,6

mg/dl für CRP) wurde in unserer Untersuchung die MVD in die Analyse eingeschlossen. Die MVD stellte sich in dieser Analyse als signifikanter Prognosefaktor für das Überleben in der multivariaten Analyse heraus ( $P<0,03$ ).



**Abbildung 5.**

Überlebenskurven von unvorbehandelten Patienten mit multiplem Myelom nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der Knochenmark-Vaskularisation (Cut-off: 48 Mikrogefäße/mm<sup>2</sup>). Patienten mit hoher MVD (durchgezogene Linie) haben ein signifikant kürzeres krankheitsbedingtes Überleben als Patienten mit einer niedrigen MVD (gepunktete Linie) ( $P<0,01$ ).

#### **4.3. Veränderungen der Angiogenese unter Chemotherapie und die prognostische Relevanz dieser Veränderungen für das progressionsfreie Überleben**

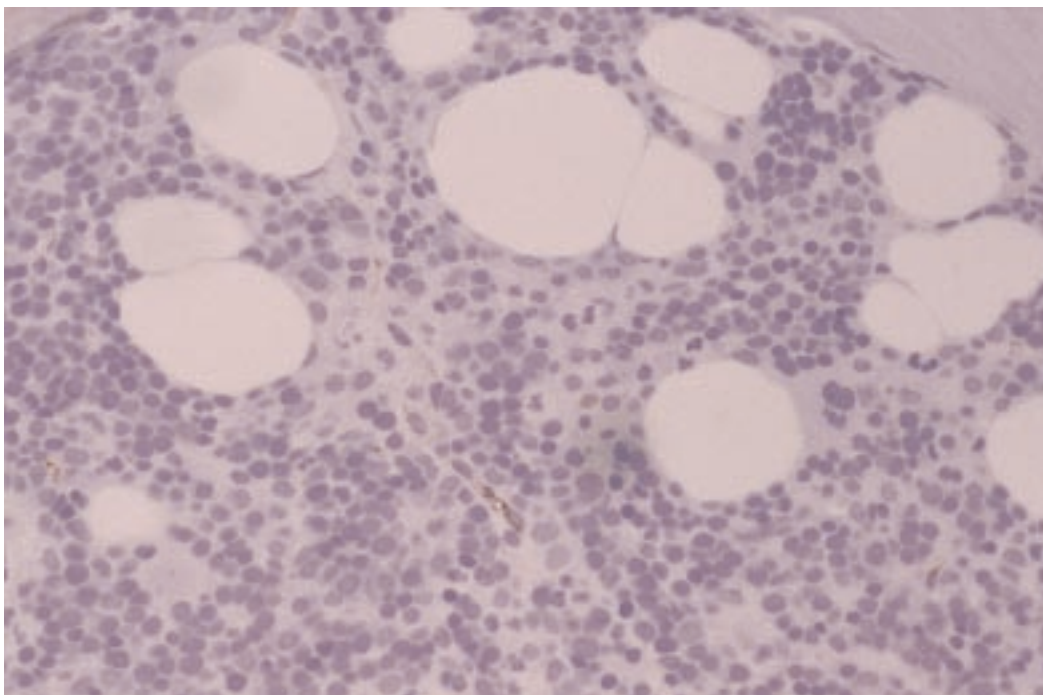
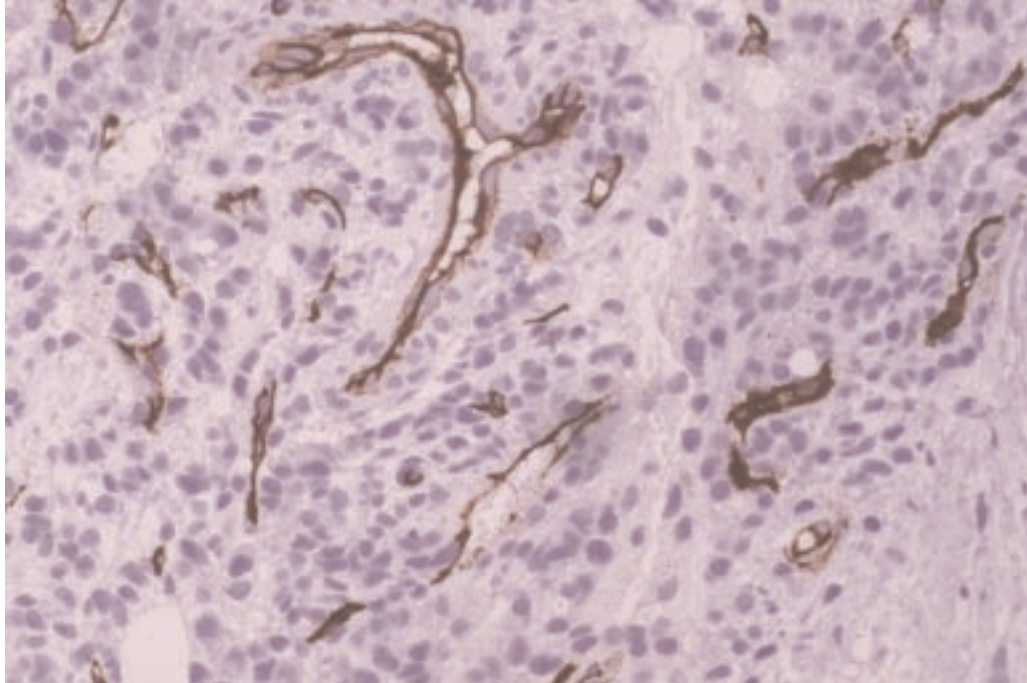
In dieser Untersuchung wurde die Veränderung der MVD im Knochenmark bei Patienten mit multiplem Myelom, die eine komplette oder partielle Remission nach einer Chemotherapie erreichten, im Vergleich zu Nicht-Ansprechern analysiert. Für diese Untersuchung wurden 42 Paraffin-eingebettete Knochenmarkbiopsien von 21 Patienten im Stadium III untersucht. Das mediane Alter der Patienten mit multiplem Myelom im Stadium III betrug 60 Jahre (48-70). 14 Patienten wiesen ein IgG, 3 Patienten ein IgA und 4 Patienten ein Bence-Jones Myelom auf. Die Knochenmarkbiopsate wurden zweimal für die Therapiebeurteilung entnommen: Die erste Biopsie erfolgte unmittelbar vor dem Beginn der Chemotherapie bei unvorbehandelten Patienten und die zweite Biopsie nach dem Ende der Behandlung. Dies erfolgte im Median nach 1,6 Monaten nach dem ersten Tag des letzten Chemotherapiezyklus. 15 Patienten erhielten eine konventionell-dosierte Chemotherapie und bei 6 Patienten wurde eine Hochdosischemotherapie mit autologer peripherer Stammzell-transplantation durchgeführt. Die konventionell-dosierte Therapie setzte sich entweder aus Melphalan und Prednison (MP) oder aus Vincristin, Adriamycin und Dexamethason (VAD) zusammen. In der transplantierten Gruppe wurde die Hochdosistherapie mit hochdosiertem Melphalan (200 mg/m<sup>2</sup>) durchgeführt. Innerhalb der 21 untersuchten Patienten erreichten 15 eine komplette oder partielle Remission nach der Therapie.

Das mediane Intervall der Beobachtungen vor der Therapie bis nach der Therapie betrug 303 Tage bei Ansprechern und 198 Tage bei Nicht-Ansprechern, der Unterschied war nicht signifikant. Insbesondere war der Abstand zwischen den Meßwiederholungen auch bei den Nicht-Ansprechern für eine Beurteilung der Veränderungen der MVD ausreichend groß.

Beispiele für die immunohistochemisch gefärbten Knochenmarkbiopsien der Patienten mit multiplem Myelom sind auf den nächsten Seiten in den Abbildungen 6-11 dargestellt.

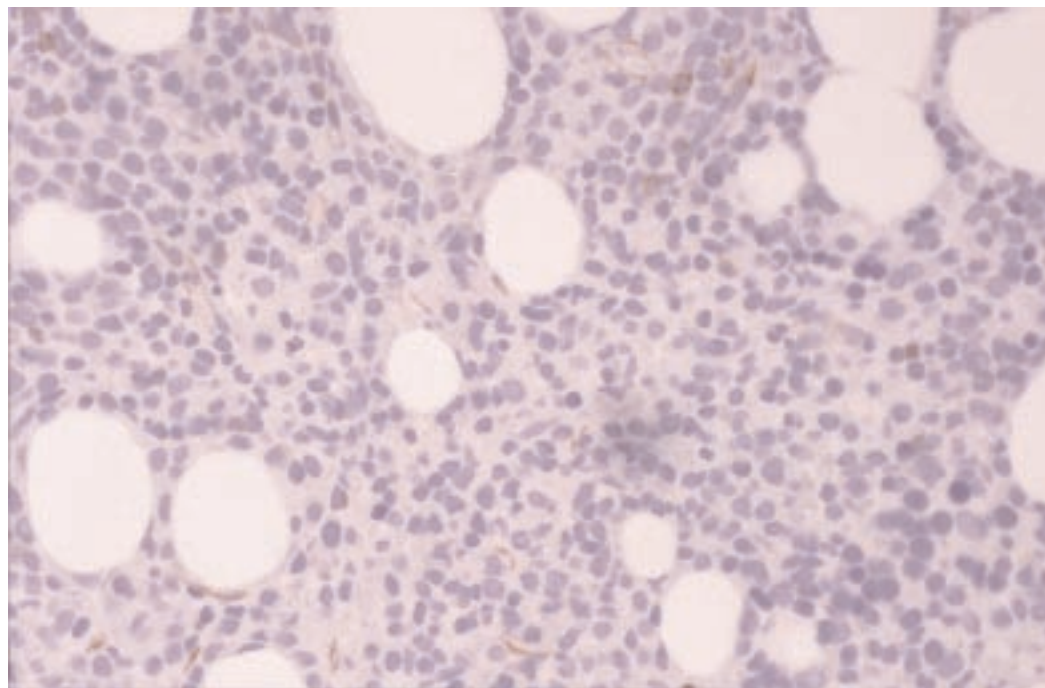
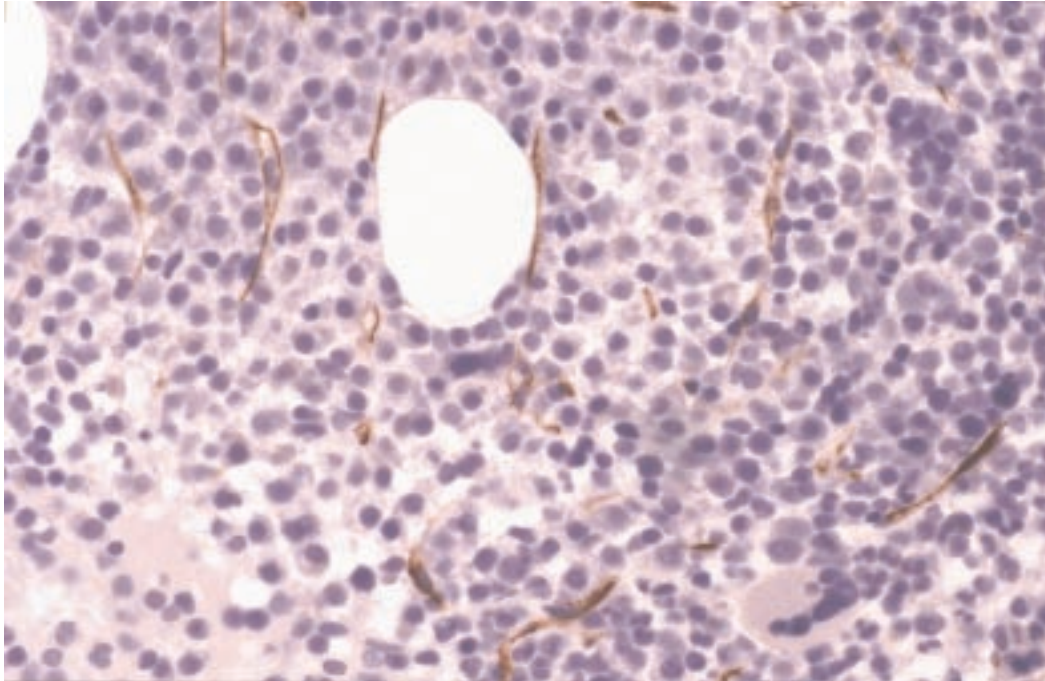
### Abbildungen 6-11.

Immunohistochemisch gefärbte Knochenmarkbiopsate von Patienten mit multiplem Myelom (400fache Vergrößerung).



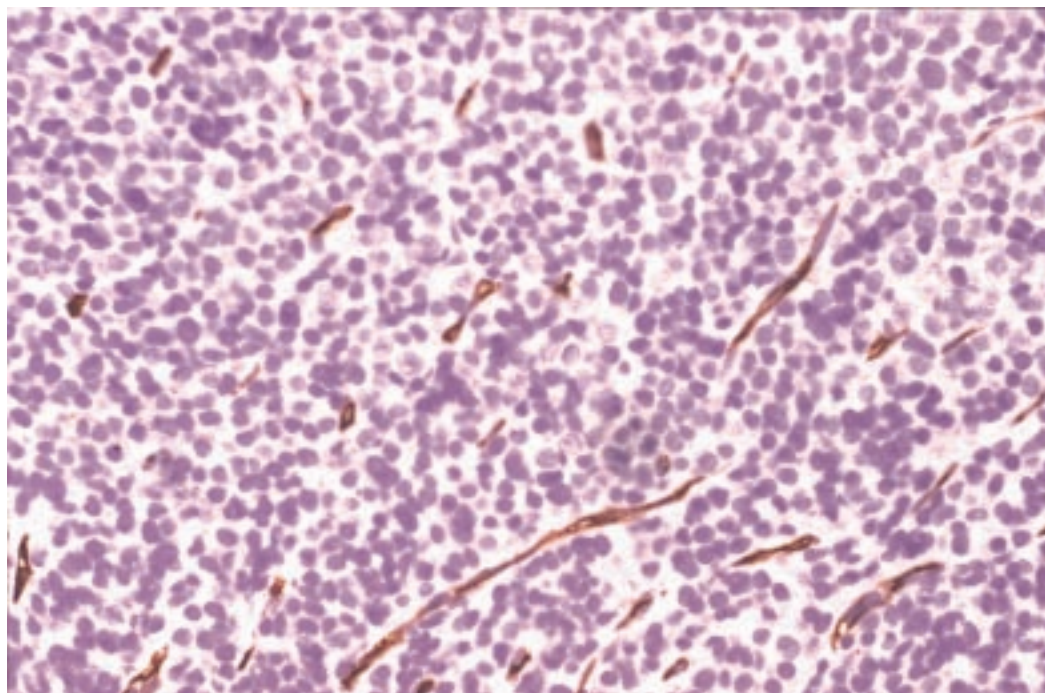
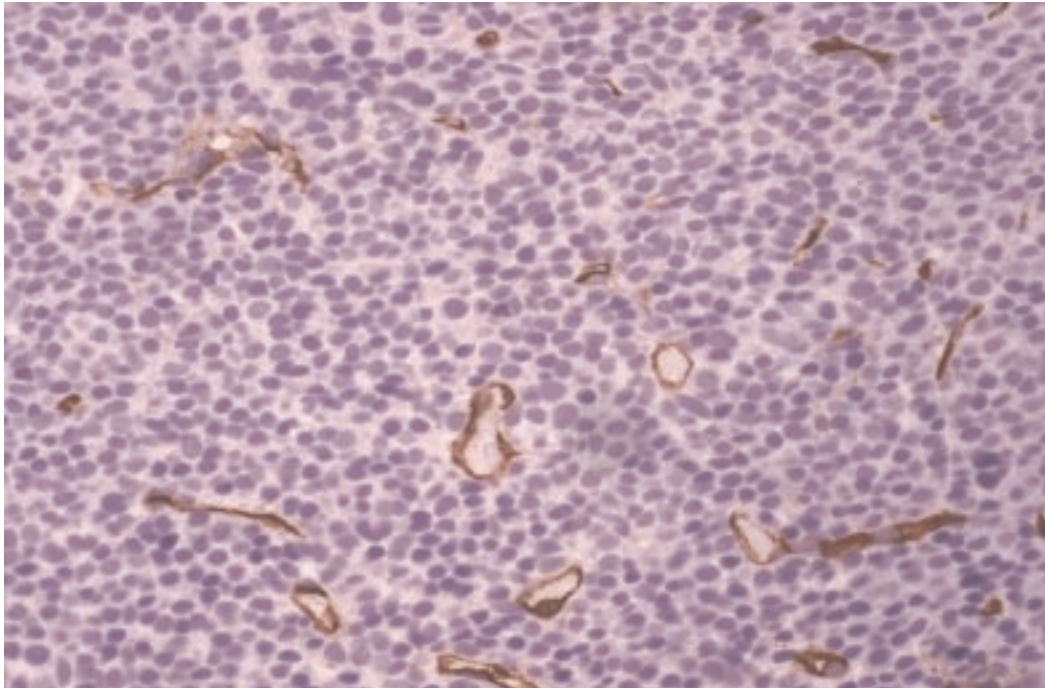
**Abbildung 6** zeigt eine hohe Gefäßdichte (microvessel density, MVD) vor der Therapie mit zahlreichen dünnen, geschlängelten und spreitenden Gefäßen mit oder ohne sichtbares Lumen. **Abbildung 7** demonstriert eine niedrige MVD des selben Patienten nach der Therapie, zum Zeitpunkt des Erreichens einer Remission nach konventionell-dosierter Chemotherapie.





**Abbildung 8** und **Abbildung 9** stellen korrespondierend eine hohe MVD vor der Therapie und eine niedrige MVD nach der Therapie eines Patienten dar, der eine komplette Remission nach der Hochdosischemotherapie erreichte.





**Abbildung 10** und **Abbildung 11** demonstrieren die MVD vor bzw. nach der Therapie bei einem Patienten, der keine Remission nach der Chemotherapie erreichte.

Die mediane MVD vor dem Beginn der Chemotherapie betrug 53,1 Gefäße/mm<sup>2</sup> (Spannweite 15,5-174,7 Gefäße/mm<sup>2</sup>). Die MVD der Patienten, die nach der Therapie eine Remission erreichten und die MVD der Nicht-Ansprecher war bei der primären Messung vor der Therapie nicht unterschiedlich ( $P=0,56$ ). Im Gegensatz dazu unterschied sich die MVD nach der Therapie signifikant zwischen den beiden Gruppen: die mediane MVD betrug bei den Ansprechern 25,1 Gefäße/mm<sup>2</sup> und bei Nicht-Ansprechern 84,0 Gefäße/mm<sup>2</sup> ( $P=0,001$ ). Die MVD-Werte sowohl vor als auch nach der Therapie wurden in der Abbildung 12 dargestellt. Obwohl die MVD bei Nicht-Ansprechern unverändert blieb, kam es bei Patienten mit Remission zu einer signifikanten Reduktion ( $P=0,001$ ; Tabelle 10). Die mediane Reduktion der MVD betrug 58% bei den Therapie-Ansprechern. Die Abnahme der MVD zum Zeitpunkt der Remission war im Vergleich zu den Werten vor der Therapie sowohl in der Gruppe der konventionell behandelten Patienten ( $P=0,007$ ) als auch bei Patienten, die eine Hochdosischemotherapie mit Stammzelltransplantation erhielten ( $P=0,043$ ), signifikant.

Die Assoziation des Chemotherapie-induzierten Abfalls der MVD im Knochenmark mit dem progressionsfreien Überleben ist in der Abbildung 13 dargestellt. Das mediane progressionsfreie Überleben betrug bei den Patienten, die nach Chemotherapie eine Reduktion der Angiogenese zeigten, 23,3 Monate im Vergleich zu 7,1 Monaten bei Patienten ohne Reduktion der Angiogenese ( $P=0,006$ ) (Sezer et al. 2000j).

Im Weiteren verglichen wir die MVD der Myelom-Patienten im Stadium III mit der von Patienten im Stadium I ( $n=15$ , medianes Alter 65). Vor der Chemotherapie war die MVD der Patienten im Stadium III signifikant höher als die MVD der Patienten im Stadium I (Median MVD 53,1 versus 23,7;  $P=0,026$ ). Nach der Therapie zeigte sich kein statistischer Unterschied mehr zwischen den Stadium III Patienten, die eine Remission erreichten (Median 25,1; Mittelwert 23,9) und den unbehandelten Stadium I Patienten (Median 23,7; Mittelwert 36,9) (Sezer et al. 2001b).

**Tabelle 9.**

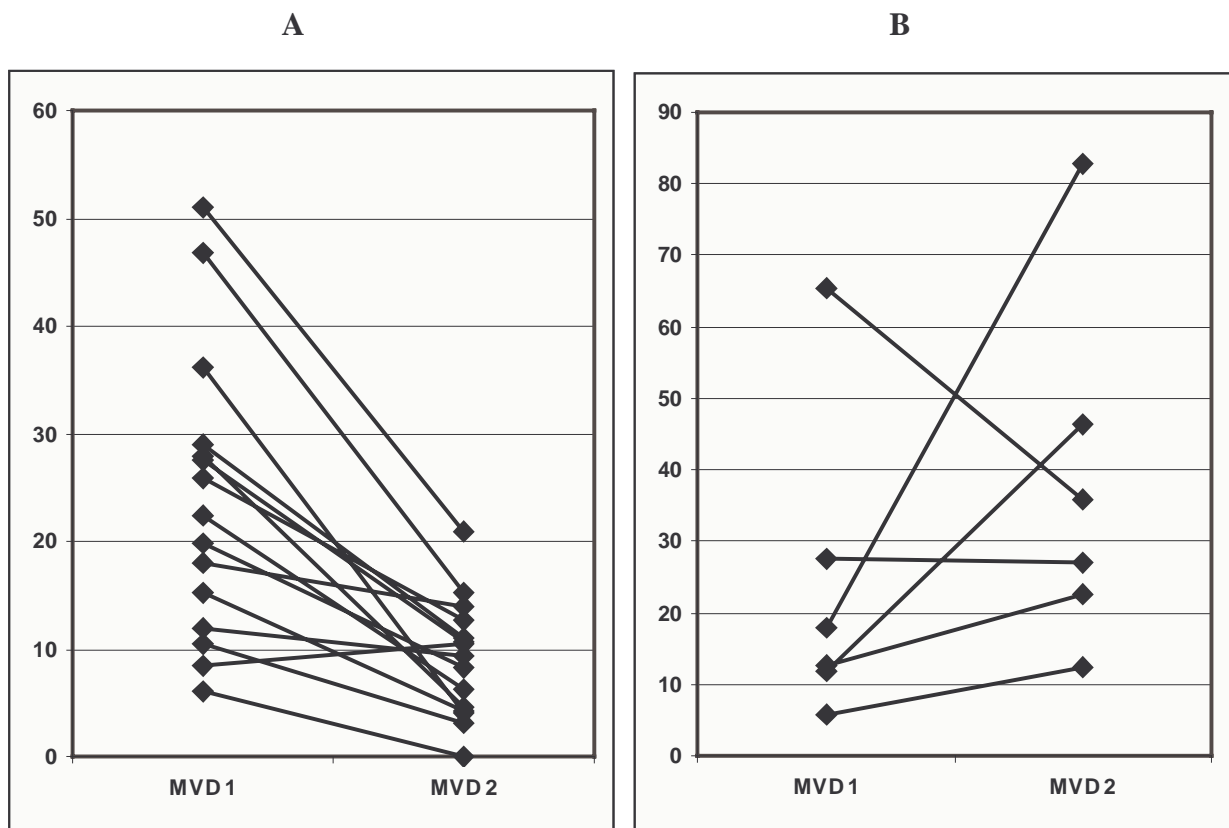
Klinische Daten der Patienten mit multiplem Myelom im Stadium III und der Anteil der Patienten mit einem Abfall der MVD im Knochenmark nach Chemotherapie. Patienten, die eine komplette oder partielle Remission erreichten, wurden als Ansprecher bezeichnet.

	Ansprecher	Nicht- Ansprecher
Anzahl	15	6
Alter (Median)	60	60
Anzahl der Patienten mit einem Abfall der MVD nach der Chemotherapie	14/15	1/6
Anzahl der Patienten mit einem Abfall der MVD nach der konventionell-dosierten Chemotherapie	9/10	1/5
Anzahl der Patienten mit einem Abfall der MVD nach der Hochdosischemotherapie und autologen peripheren Stammzelltransplantation	5/5	0/1

**Tabelle 10.**

MVD und Plasmazellinfiltration im Knochenmark vor und nach der Chemotherapie bei Ansprechern und Nicht-Ansprechern.

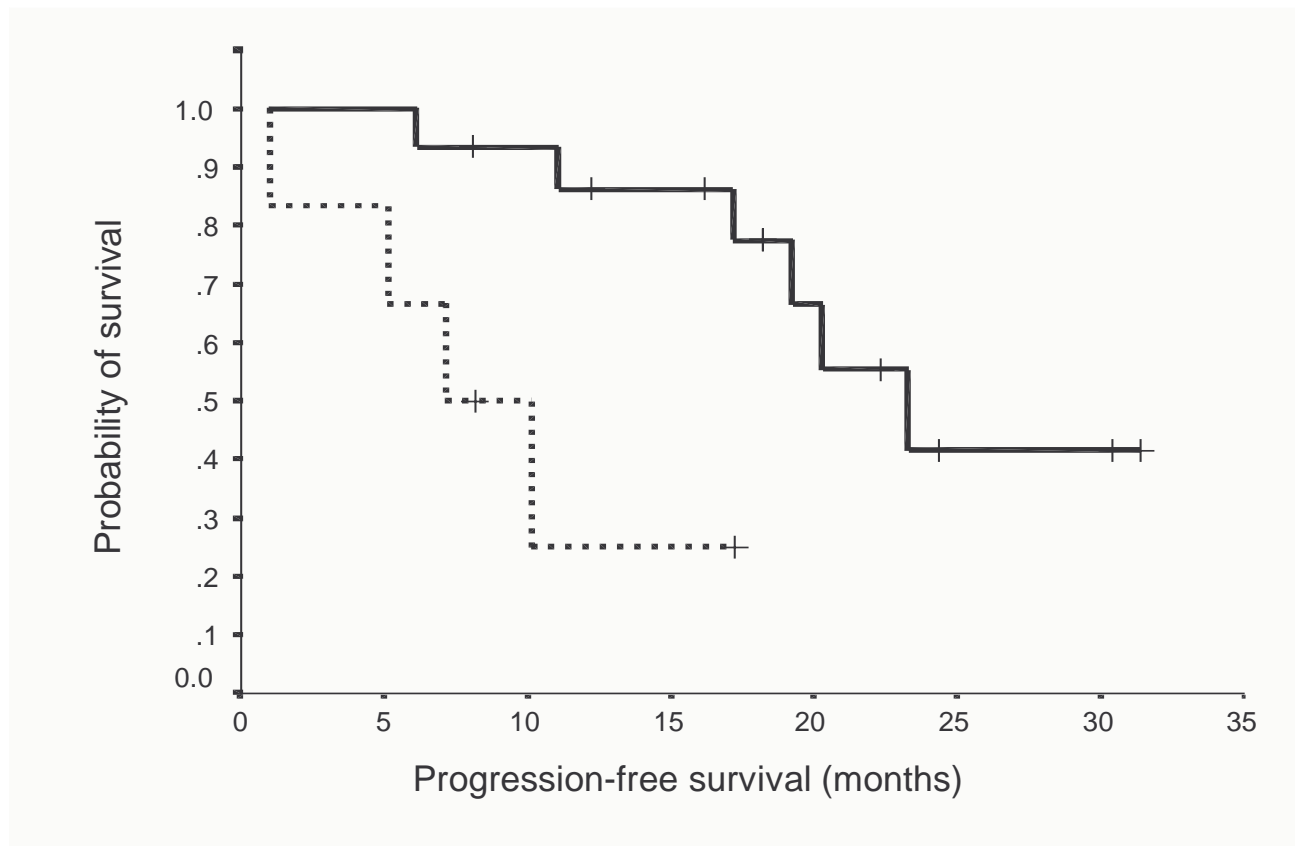
	Ansprecher			Nicht-Ansprecher		
	vor	nach	<i>P</i>	vor	nach	<i>P</i>
	Chemotherapie			Chemotherapie		
Mediane MVD im Knochenmark (Kapillaren/mm²)	59,5	25,1	<i>P</i> =0,001	40,9	84,0	<i>P</i> =0,249
Mediane Plasmazellinfiltration im Knochenmark (%)	25	15	<i>P</i> =0,068	30	35	<i>P</i> =0,854



**Abbildung 12.**

MVD vor (MVD 1) und nach (MVD 2) Chemotherapie bei den individuellen Patienten.

(A) Patienten, die eine Remission nach Chemotherapie erreichten, (B) Patienten, die auf die Therapie nicht ansprachen.



**Abbildung 13.**

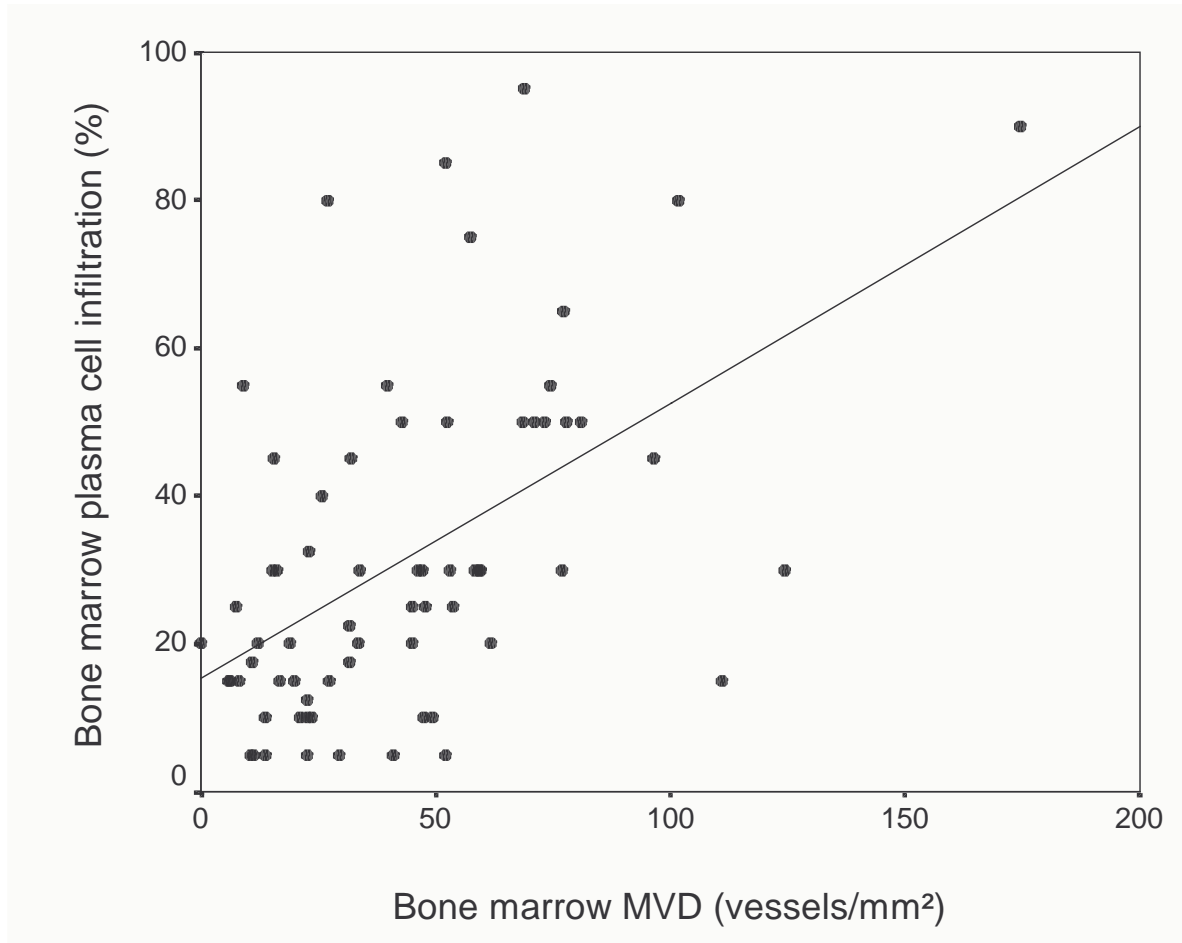
Kaplan-Meier Kurven des progressionsfreien Überlebens (PFS) in zwei Gruppen von Patienten: Patienten mit einer Reduktion der MVD nach Chemotherapie (durchgezogene Linie) haben ein signifikant längeres PFS ( $P=0,006$ ) als Patienten, die keine Reduktion der MVD nach Therapie erreichten (gepunktete Linie).

#### **4.4. Korrelation zwischen der Angiogenese und der Plasmazellinfiltration sowie dem Serum $\beta$ 2-Mikroglobulin bei Patienten mit multiplem Myelom**

Das Ziel der hier präsentierten Untersuchung war, die Korrelation zwischen der Angiogenese und der Plasmazellinfiltration im Knochenmark sowie der  $\beta$ 2-MG-Konzentration im Serum bei unvorbehandelten und behandelten Patienten mit multiplem Myelom zu analysieren. Untersucht wurden 91 in Paraffin eingebettete Knochenmarkbiopsien von 69 erwachsenen Patienten mit multiplem Myelom (22 Frauen und 47 Männer). Die Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt: Der ersten Gruppe gehörten solche Patienten an, bei denen die Knochenmarkbiopsien direkt vor dem Beginn einer Chemotherapie vorlagen. Diese Gruppe bestand aus 56 Patienten mit neu diagnostiziertem multiplen Myelom und 11 Patienten mit rezidivierter Erkrankung vor einer erneuten Behandlung. Die zweite Gruppe bildeten 24 Patienten, bei denen die Biopsie nach dem Ende der Chemotherapie durchgeführt wurde. Das Zeitintervall zwischen dem letzten Tag der Chemotherapie und der zweiten Knochenmarkbiopsie betrug im Median 47 Tage. Die Behandlung bestand bei 17 Patienten aus einer konventionell-dosierten Chemotherapie und bei 7 Patienten wurde eine Hochdosischemotherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation durchgeführt. Unter den untersuchten 24 Patienten erreichten 18 eine komplette oder partielle Remission nach der Chemotherapie.

Von den 91 Knochenmarkbiopsien wurden 23 Biopsien von 23 Patienten im Stadium I und 68 Biopsien von 46 Patienten im Stadium II/III entnommen. Die mediane MVD im Knochenmark betrug 22,7 Gefäße/mm<sup>2</sup> (Spannweite 5,8-111 Gefäße/mm<sup>2</sup>) bei Patienten im Stadium I und 41,8 Gefäße/mm<sup>2</sup> (Spannweite 0-220 Gefäße/mm<sup>2</sup>) bei Patienten im Stadium II/III ( $P<0,01$ ).

Bei 67 Patienten erfolgte die Biopsie vor der Behandlung (Gruppe 1) und bei 24 Patienten nach Chemotherapie (Gruppe 2). Wie in der Tabelle 11 und in der Abbildung 14 dargestellt, bestand innerhalb der Gruppe 1 eine Korrelation zwischen der MVD im Knochenmark (Median 39,6 Gefäße/mm<sup>2</sup>) und der Plasmazellinfiltration (Median 25%,  $r=0,521$ ,  $P<0,001$ ), während nach der Chemotherapie keine Korrelation mehr vorlag (mediane MVD 31,0 Gefäße/mm<sup>2</sup> und 20% Plasmazellinfiltration,  $r=0,208$ ,  $P=0,329$ ).



**Abbildung 14.**

Korrelation der MVD und der Plasmazellinfiltration bei 67 Patienten mit multiplem Myelom vor einer Chemotherapie ( $r=0,521$ ,  $P<0,01$ ).



Darüber hinaus fanden wir eine Korrelation zwischen der MVD und der  $\beta$ 2-MG-Konzentration im Serum bei den 67 Patienten vor einer Chemotherapie (medianes  $\beta$ 2-MG 2,5 mg/l;  $r=0,509$ ;  $P<0,001$ ). In der Gruppe 2 fand sich wiederum keine signifikante Korrelation zwischen diesen Parametern (medianes  $\beta$ 2-MG 2,55 mg/l;  $r= -0,072$ ;  $P=0,737$ ). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Tabelle 11 zusammengefaßt. Die Angiogenese im Knochenmark korrelierte in keiner der Gruppen mit der Konzentration des Immunglobulins, des CRP im Serum oder mit dem Serum-Calciumspiegel.

**Tabelle 11.**

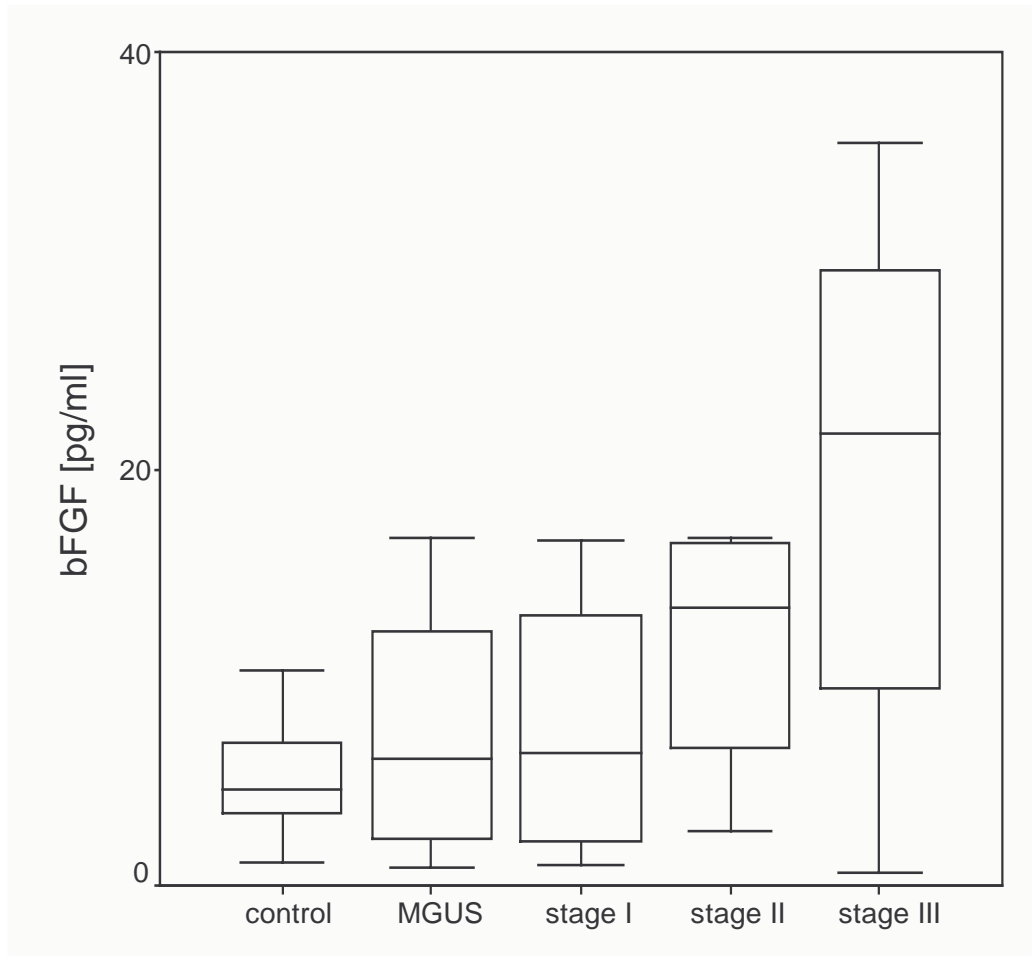
Klinische Daten, microvessel density (MVD) und Plasmazellinfiltration im Knochenmark bei Patienten mit multiplem Myelom. Die Gruppe 1 besteht aus Patienten vor einer Chemotherapie, Gruppe 2 aus Patienten nach der zytostatischen Behandlung.

	<u>Gruppe 1</u>	<u>Gruppe 2</u>	<u>Gesamt</u>
Anzahl der Knochenmarkbiopsien	67	24	91
Anzahl der Patienten	67	24	69
Patienten im Stadium I	23	0	23
Plasmazellinfiltration des Knochenmarks (%), Median (Spannweite)	25 (5-95)	20 (5-80)	25 (5-95)
MVD des Knochenmarks (Kapillaren/mm <sup>2</sup> ), Median (Spannweite)	39,6 (0-175)	31,1 (0-220)	33,6 (0-220)
Serum $\beta$ 2-Mikroglobulin (mg/l), Median (Spannweite)	2,5 (0,9-36,7)	2,5 (0,9-27,6)	2,5 (0,9-36,7)
Korrelation der MVD und Plasmazellinfiltration <i>r</i>	0,52	0,21	0,44
<i>P</i>	<0,001	0,339	<0,001
Korrelation der MVD und $\beta$ 2-MG im Serum <i>r</i>	0,51	- 0,07	0,35
<i>P</i>	<0,001	0,737	0,001

#### **4.5. Angiogenetisch wirksame Zytokine in verschiedenen Stadien des multiplen Myeloms**

Für die Zytokinmessungen wurden Serumproben von 67 Personen mit MGUS (n=11) oder multiplen Myelom (n=56) sowie von gesunden Blutspendern als Kontrollpersonen (n=20) analysiert. Das mediane Alter aller Personen mit Myelom oder MGUS lag bei 61 Jahren (39-86 Jahre), das mediane Alter der chemotherapierten Patienten betrug 60 Jahre (49-74 Jahre). Werte für bFGF, VEGF und HGF waren bei allen untersuchten Personen meßbar. Die Spannweite der Werte bei den Kontrollpersonen betrug für bFGF 1,1-10,3 pg/ml (Median 4,7) und für VEGF 36-409 pg/ml (Median 140). In den untersuchten Kollektiven lag eine Korrelation der Serumzytokinspiegel mit dem Alter nicht vor. IL-6 war bei 23 von 67 Individuen mit monoklonaler Gammopathie oder multiplen Myelom nicht detektierbar, wobei die Werte unter der Nachweisgrenze nicht bevorzugt in der Gruppe MGUS oder Stadium I auftraten.

Die Ergebnisse der Analyse von 67 Individuen mit MGUS oder multiplen Myelom sind in der Tabelle 12 dargestellt. Die bFGF Serumkonzentrationen von Patienten mit multiplen Myelom waren signifikant höher als bei Kontrollpersonen ( $P<0,001$ ). Die bFGF Spiegel (vor einer Chemotherapie) unterschieden sich signifikant zwischen den einzelnen Stadien I, II und III nach Salmon und Durie (Abb. 15). Im Gegensatz zu bFGF konnten für VEGF, HGF und IL-6 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Krankheitsstadien ermittelt werden (Tabelle 12). Serum bFGF- und  $\beta 2$ -Mikroglobulin-Spiegel waren in den Stadien II/III gegenüber Stadium I signifikant erhöht ( $P=0,02$  und  $P<0,001$ ). Für die VEGF-, HGF- und IL-6-Spiegel zeigten sich keine signifikante Unterschiede zwischen Stadium I und Stadium II/III (Tabelle 13).



**Abbildung 15.**

Serumspiegel von bFGF bei Kontrollpersonen, Individuen mit MGUS und Patienten mit multiplem Myelom in Stadium I, II und III (vor Chemotherapie).

**Tabelle 12.**

Medianwerte von bFGF, VEGF, HGF und IL-6 bei MGUS und Myelompatienten vor Chemotherapie.

	MGUS	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Kruskal-Wallis Test
	n=11	n=14	n=7	n=35	
bFGF (pg/ml)	6,2	6,3	13,4	21,7	$P=0,02$
VEGF (pg/ml)	167	239	189	212	$P=0,80$
HGF (pg/ml)	1281	1345	1900	1498	$P=0,23$
IL-6 (pg/ml)	3,1	3,2	7,3	6,2	$P=0,25$

**Tabelle 13.**

Medianwerte von bFGF, VEGF, HGF und IL-6 im Serum von Patienten mit multiplem Myelom im Stadium I (n=14) versus Stadium II/III (n=42).

	Stadium I	Stadium II/III	Mann-Whitney U Test
bFGF (pg/ml)	6,3	16,5	$P=0,02$
VEGF (pg/ml)	239	206	$P=0,82$
HGF (pg/ml)	1345	1568	$P=0,21$
IL-6 (pg/ml)	3,2	6,3	$P=0,22$

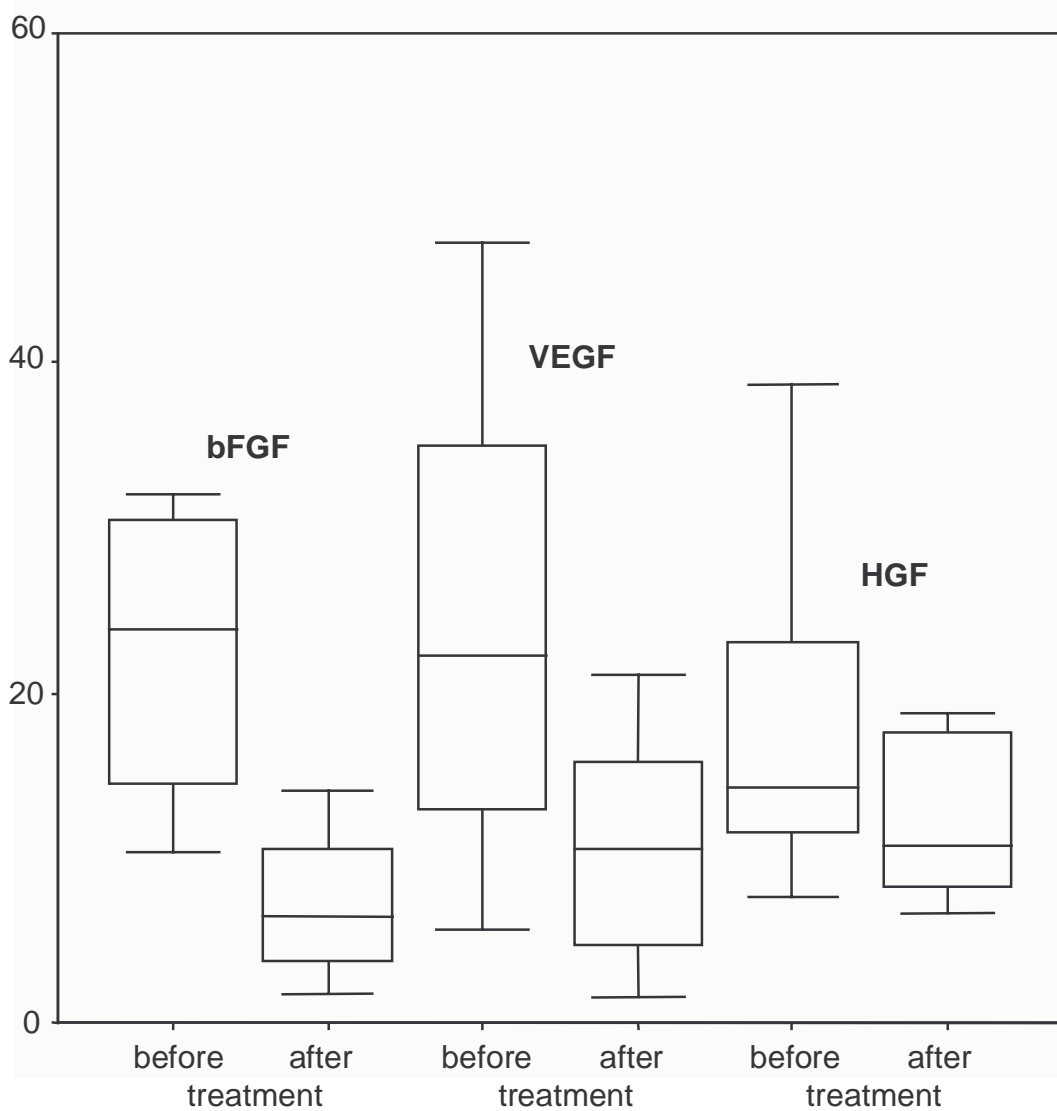
#### **4.6. Veränderungen der Zytokinspiegel unter Therapie des multiplen Myeloms**

Um den Einfluß der Chemotherapie auf die Spiegel von bFGF, VEGF und HGF zu untersuchen, wurden bei 32 Patienten in den Stadien II/III die Werte vor Beginn und nach Abschluß der Chemotherapie miteinander verglichen. 25 Patienten erhielten eine konventionell-dosierte Chemotherapie und 7 Patienten eine Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer peripherer Stammzelltransplantation. Diese Ergebnisse wurden in der Tabelle 14 dargestellt. Entsprechend den Kriterien von Chronic Leukemia and Myeloma Task Force erreichten 21 Patienten eine Remission nach Chemotherapie, während 11 Patienten kein Ansprechen auf die Therapie zeigten. Die  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Werte zeigten einen signifikanten Abfall bei den Patienten, die eine Remission erreichten, nicht jedoch bei den Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen. Innerhalb der Ansprecher zeigte sich ein signifikanter Abfall der bFGF-, VEGF- und HGF-Spiegel im Vergleich zu den Konzentrationen vor Beginn der Chemotherapie (Abb. 16). Die Medianwerte für bFGF waren 23,9 pg/ml vor der Behandlung versus 6,5 pg/ml nach dem Erreichen einer Remission ( $P < 0,001$ ), dieser Wert lag bereits nahe dem Medianwert für das Normalkollektiv. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Patienten, die keine Remission erreichten, auch keine signifikante Veränderung der bFGF-, VEGF- und HGF- Serumspiegel (Tabelle 14) (Sezer et al. 2001a).

**Tabelle 14.**

Medianwerte vor und nach Chemotherapie von bFGF, VEGF, HGF und IL-6 im Serum von Patienten nach Ansprechen (n=21) und Nicht-Ansprechen (n=11) auf die Chemotherapie.

	Ansprechen		Nicht-Ansprechen		Wilcoxon Test	
	vor Therapie	nach Therapie	vor Therapie	nach Therapie	Ansprechen	Nicht-Ansprechen
bFGF (pg/ml)	23,9	6,5	13,3	18,1	$P<0,001$	$P=0,65$
VEGF (pg/ml)	223	105	271	251	$P=0,02$	$P=0,93$
HGF (pg/ml)	1429	1077	1554	2011	$P=0,02$	$P=0,68$
IL-6 (pg/ml)	6,9	3,9	4,7	6,9	$P=0,79$	$P=0,59$



**Abbildung 16.**

Serumspiegel von bFGF, VEGF, HGF und IL-6 vor und nach Chemotherapie bei Myelompatienten, die eine Remission erreichten. Für bFGF, VEGF und HGF sind die Werte auf der Ordinate in 1x pg/ml, bzw. 10x pg/ml und 100x pg/ml aufgetragen.



#### 4.7. Korrelationen angiogenetisch wirksamer Zytokine beim multiplen Myelom

Korrelationen zwischen bFGF, VEGF, HGF, IL-6 und  $\beta$ 2-Mikroglobulin bei unbehandelten Individuen mit MGUS und Myelom sind in der Tabelle 15 gezeigt. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen bFGF, VEGF und HGF im Spearman-Rank Test. Beide angiogenetischen Zytokine, bFGF und HGF, korrelieren signifikant mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin.

**Tabelle 15.**

Korrelationen im Spearman-Rank Test zwischen angiogenetischen Zytokinen, IL-6 und  $\beta$ 2-Mikroglobulin bei Patienten mit MGUS oder multiplem Myelom vor einer Chemotherapie (n=67).

	bFGF		VEGF		HGF		IL-6		$\beta$ 2-MG	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
bFGF	-		0,33	0,01	0,25	<0,05	0,19	0,14	0,26	0,04
VEGF	0,33	0,01	-		0,26	0,04	0,08	0,6	-0,34	0,78
HGF	0,25	<0,05	0,26	0,04	-		0,15	0,55	0,49	<0,01
IL-6	0,19	0,14	0,08	0,6	0,15	0,55	-		0,42	0,01
$\beta$ 2-MG	0,26	0,04	-0,34	0,78	0,49	<0,01	0,42	0,01	-	

#### **4.8. Prognostische Relevanz der zytogenetischen Veränderungen beim multiplen Myelom**

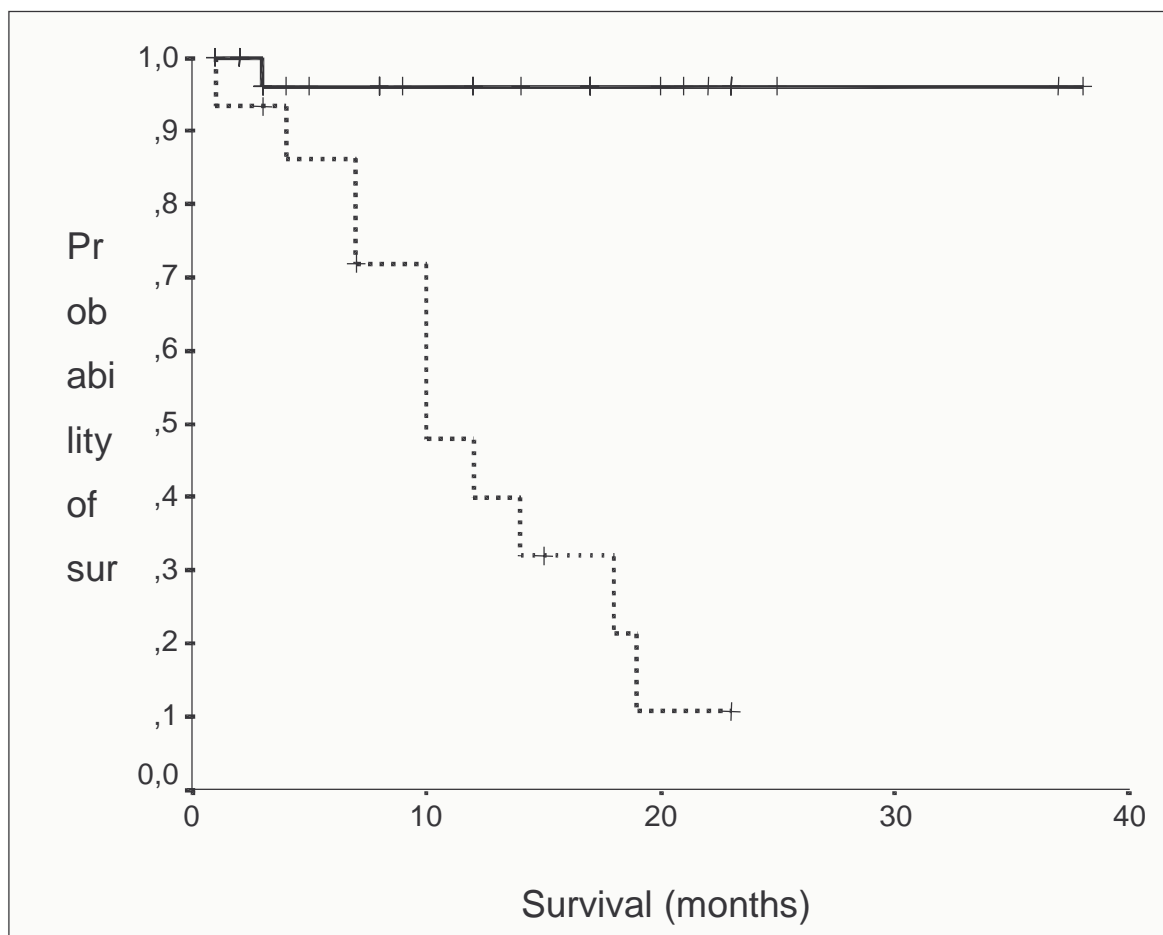
Bei 46 Patienten mit multiplen Myelom wurden zytogenetische Untersuchungen im Knochenmark durchgeführt. Das Kollektiv bestand aus 25 Männern und 21 Frauen, das mediane Alter lag bei 63 Jahren ( $\pm 8$  Jahren). 12 Patienten befanden sich im Stadium I der Erkrankung, 2 Patienten im Stadium II und 32 Patienten im Stadium III. 26 der 46 Patienten waren zum Zeitpunkt der zytogenetischen Untersuchung unvorbehandelt.

Bei 15 Patienten ergab sich in den zytogenetischen Untersuchungen eine chromosomale Aberration. In der konventionellen Metaphasenanalyse stellte sich bei 11 Patienten ein aberranter Karyotyp dar. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erbrachte das Ergebnis, daß bei 11 Patienten eine Deletion des *RB-1*-Lokus (13q14) und bei 8 Patienten eine Deletion des *p53*-Lokus (17p13.1) vorlag. Zur Beurteilung des Einflusses einer zytogenetischen Veränderung auf die krankheitsbezogene Überlebenszeit wurde das Patientenkollektiv in Patienten mit und ohne zytogenetische Veränderung dichotomisiert. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit zwischen den beiden Gruppen: Die mediane Überlebenszeit der 15 Patienten mit einer zytogenetischen Aberration lag bei 10 Monaten, während die mediane Überlebenszeit in dem Kollektiv ohne zytogenetische Veränderungen noch nicht erreicht wurde ( $P < 0,0001$ ) (Abb. 17).

Desweiteren wurde der Einfluß der 13q14-Deletion (*RB-1*-Lokus) sowie der 17p13.1-Deletion (*p53*-Lokus) auf die krankheitsbezogene Überlebenszeit getrennt untersucht (Abb. 18 und 19). Beide Deletionen waren jeweils mit einer signifikanten Verkürzung der Überlebenszeit beim multiplen Myelom verbunden. Beim Vorliegen einer Deletion der 13q14-Region (Abb. 18) hatten die Patienten eine signifikant kürzere Überlebenszeit als Patienten ohne diese Veränderung ( $P = 0,002$ ). Auch die 17p13.1-Deletion des *p53*-Lokus ging mit einer signifikant ( $P = 0,008$ ) reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit einher (Abb. 19).

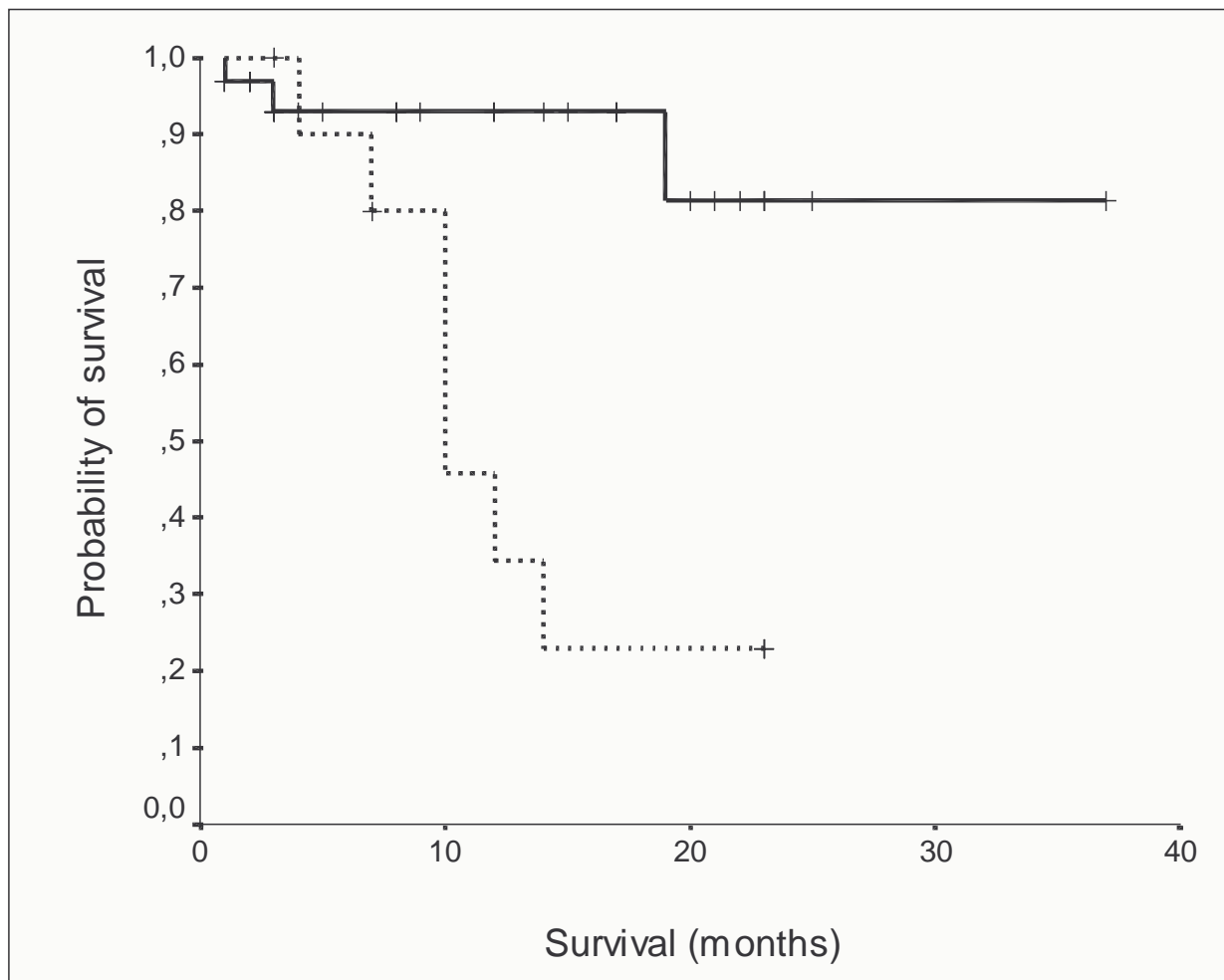
Patienten mit oder ohne zytogenetische Veränderungen wurden hinsichtlich klinischer und laborchemischer Parameter sowie ihrer angiogenetischen Aktivität im Knochenmark miteinander verglichen. Signifikante Unterschiede fanden sich in den beiden Patientengruppen

für die  $\beta$ 2-Mikroglobulinkonzentration im Serum (2 mg/l versus 5,4 mg/l;  $P<0,001$ ) und in dem Grad der histologisch ermittelten Plasmazellinfiltration im Knochenmark (30% versus 55%;  $P<0,001$ ). Ein weiterer angedeuteter Unterschied, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte, war die MVD im Knochenmark als Maß der angiogenetischen Aktivität: in der Gruppe der Patienten ohne Aberration lag die mediane MVD bei 29,6 Kapillaren/mm<sup>2</sup> und in der Gruppe mit Aberration bei 60,4 Kapillaren/mm<sup>2</sup> ( $P=0,15$ ). Beim Vergleich der zwei Patientengruppen mit und ohne zytogenetische Veränderungen zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Geschlechts, des Alters zum Zeitpunkt der Untersuchung, des Krankheitsstadiums nach Durie & Salmon, der Konzentration des Paraproteins sowie des CRP im Serum.



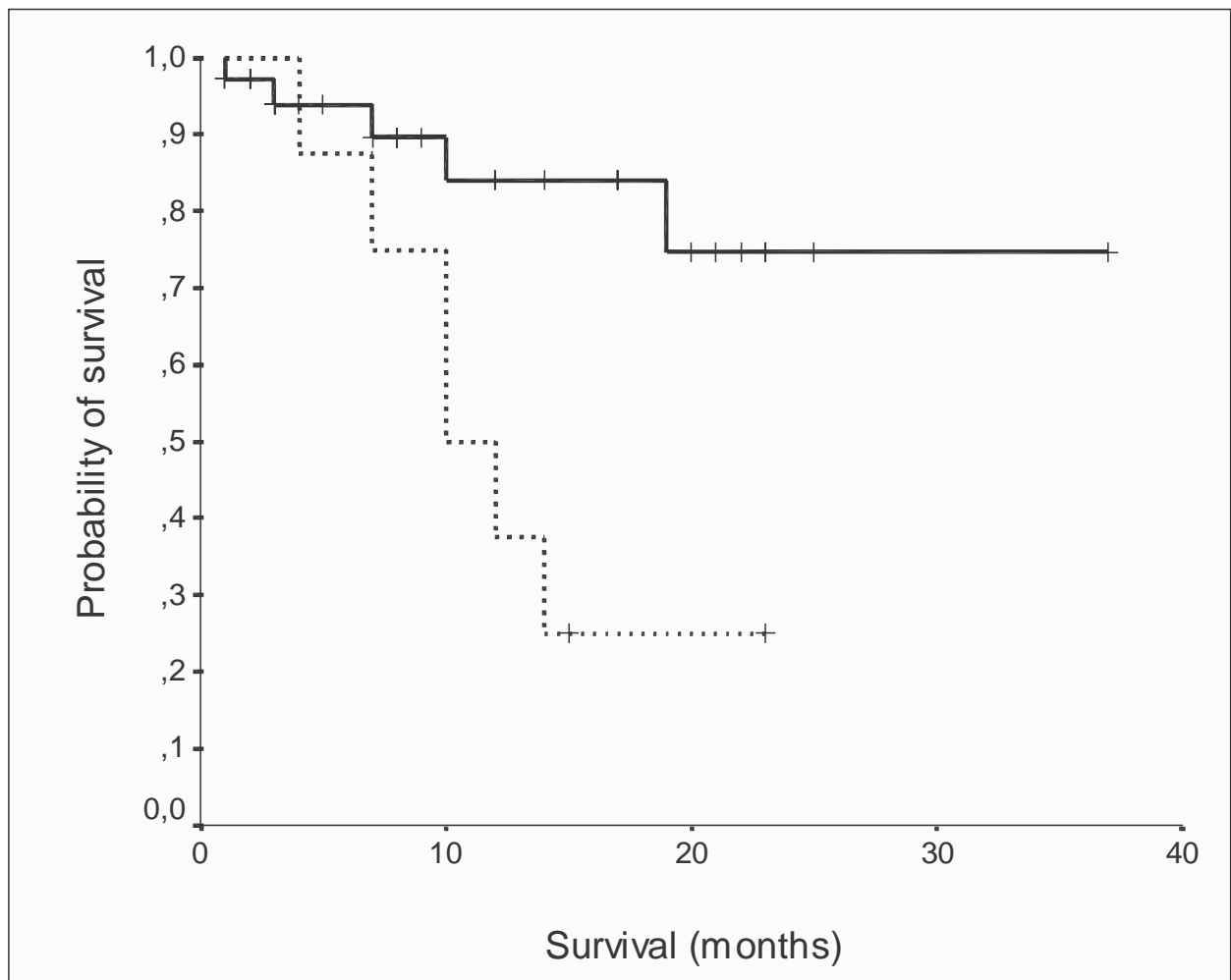
**Abbildung 17.**

Kaplan-Meier-Kurven der krankheitsbezogenen Überlebenszeit bei Patienten mit multiplem Myelom in Abhängigkeit von einer zytogenetischen Aberration. Patienten mit einer zytogenetischen Aberration (gepunktete Linie) weisen ein signifikant kürzeres Überleben als Patienten ohne eine zytogenetische Veränderung auf (durchgezogene Linie) ( $P < 0,0001$ ).



**Abbildung 18.**

Krankheitsbezogene Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit multiplem Myelom in Abhängigkeit von der 13q14-Deletion (*RB-1*-Lokus). Patienten mit der 13q14-Deletion (gepunktete Linie) weisen eine signifikant ( $P=0,002$ ) geringere Überlebenswahrscheinlichkeit gegenüber Patienten ohne diese Veränderung auf (durchgezogene Linie).



**Abbildung 19.**

Krankheitsbezogene Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit multiplem Myelom in Abhängigkeit von der 17p13.1-Deletion des *p53*-Lokus. Patienten mit der 17p13.1-Deletion (gepunktete Linie) weisen eine signifikant ( $P=0,008$ ) geringere Überlebens-wahrscheinlichkeit gegenüber Patienten ohne diese Veränderung auf (durchgezogene Linie).

#### 4.9. Knochenresorption

Das untersuchte Kollektiv bestand aus 44 weiblichen und 28 männlichen Individuen mit der Diagnose MGUS (n=12) oder multiples Myelom (n=60). Das mediane Alter aller Personen lag bei 62 Jahren (MGUS: 58 Jahre, multiples Myelom Stadium I-III: 63 Jahre), mit einer Spannweite von 38 bis 86 Jahren. Werte für ICTP, NTx, und DPD waren bei allen untersuchten Personen meßbar. Bei 34 von 72 untersuchten Individuen (47%) waren die ICTP-Serumwerte erhöht, wobei dies häufiger in den fortgeschrittenen Myelomstadien der Fall war (80% bzw. 55% der Werte in den Stadien II und III). NTx lag bei nur 14 von 54 Messungen (26%) von Personen mit MGUS oder multiplem Myelom über der oberen Normgrenze, ebenfalls mit einer Tendenz zu erhöhten Werten in fortgeschrittenen Myelomstadien. DPD lag bei 41 von 54 Messungen (77%) über der Normgrenze, allerdings waren die erhöhten Werte in allen Gruppen von MGUS und multiplem Myelom in den Stadien I-III gleichermaßen verteilt.

Die Ergebnisse der statistischen Vergleiche zwischen den Kollektiven MGUS und multiplem Myelom sind in der Tabelle 16 dargestellt. Die ICTP-Werte unterschieden sich im Kruskal-Wallis-Test signifikant ( $P=0,002$ ) zwischen den Gruppen MGUS, Stadium I und Stadium II-III und zeigten einen geordneten Anstieg (Abb. 20). ICTP-Werte waren außerdem bei Patienten mit multiplem Myelom signifikant erhöht ( $P=0,003$ ) gegenüber Individuen mit MGUS (Abb. 21). Weiterhin zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $P=0,04$ ) zwischen den ICTP Werten der Gruppe MGUS und Myelom im Stadium I. Dennoch ist ICTP für die Differenzierung zwischen MGUS und Myelom im Stadium I nur bedingt geeignet. Bei einem Cut-off-Wert, der der oberen Normgrenze entspricht, ergibt sich eine Sensitivität von 42% bei einer Spezifität von 83%. Bei einem Cut-off-Wert 10 µg/l wird zwar eine Spezifität von 100% erreicht, die Sensitivität beträgt jedoch bei diesem Cut-off-Wert nur 16%.

Im Gegensatz zu ICTP konnten für NTx, DPD und Osteocalcin keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen MGUS, multiples Myelom im Stadium I und multiples Myelom im Stadium II-III ermittelt werden (Tabelle 16).



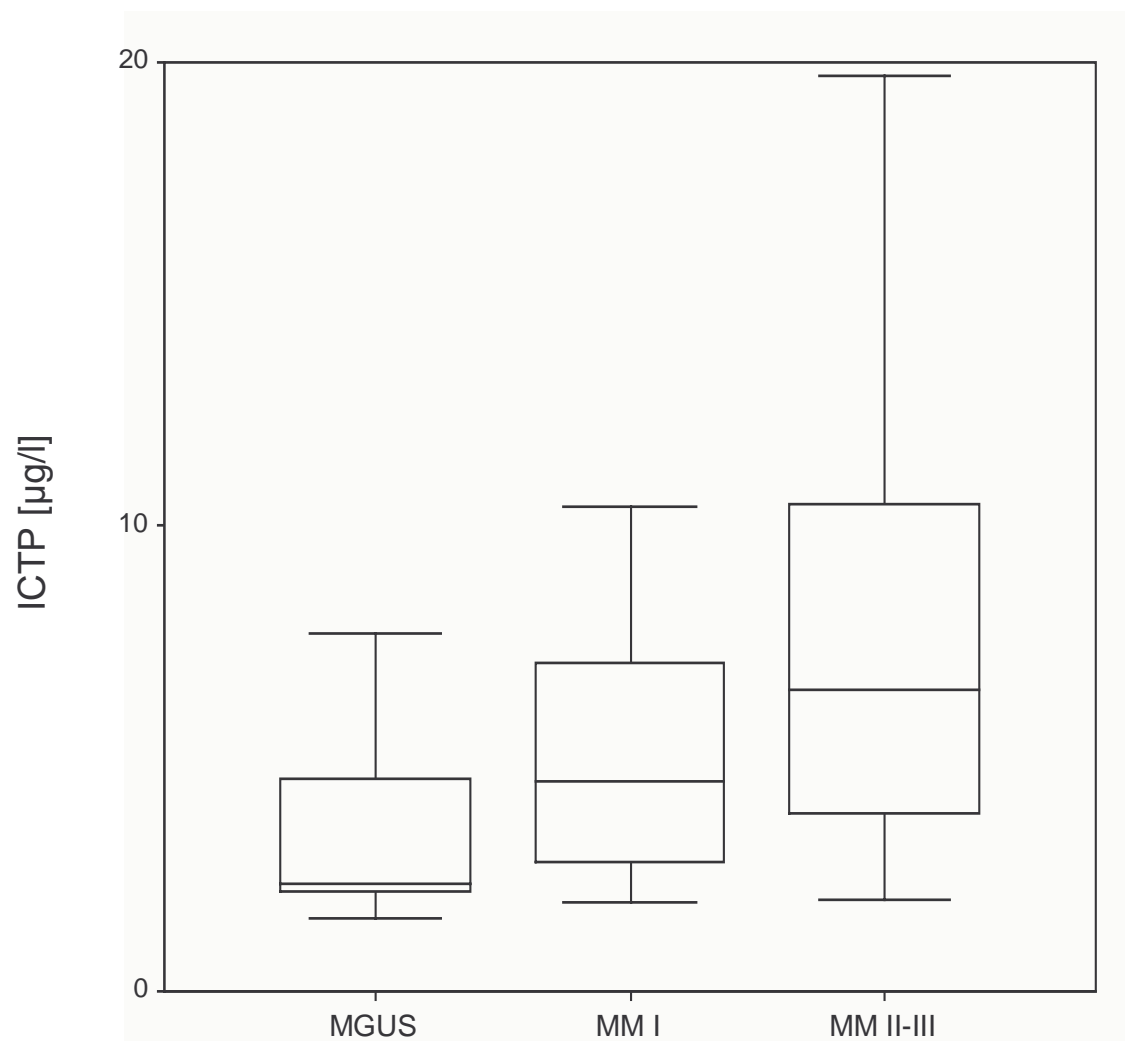
ICTP war in der Analyse nach Kaplan-Meier ein signifikanter prognostischer Faktor für das Überleben von Patienten mit multiplem Myelom ( $P=0,014$ ). Die Patientengruppe wurde nach dem Medianwert von ICTP dichotomisiert. Bei ICTP-Werten unter dem Medianwert betrug die mittlere Überlebenszeit 30,1 Monate versus 14,3 Monate bei Patienten mit ICTP-Werten über dem Median (Abb. 22). Für NTx und DPD ergab sich dagegen keine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit.

Die Korrelationen zwischen ICTP, NTx, DPD,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, CRP und den Serum-Zytokinspiegeln von bFGF, HGF, VEGF und IL-6 bei Myelompatienten sind in den Tabellen 17 und 18 dargestellt. Es fand sich eine deutliche Korrelation zwischen den Knochenstoffwechselfparametern ICTP und NTX ( $P=0,001$ ) sowie zwischen ICTP und  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $P=0,009$ ). Zwischen ICTP und Osteocalcin sowie knochenspezifischer alkalischer Phosphatase fand sich keine signifikante Korrelation, dieser Befund deutet auf die Entkopplung der osteoklastischen und osteoblastischen Aktivität hin. Bemerkenswert ist die signifikante Korrelation zwischen ICTP und den angiogenetischen Zytokinen bFGF ( $P=0,013$ ), VEGF ( $P=0,047$ ) und HGF ( $P=0,008$ ) sowie mit IL-6 ( $P=0,023$ ). DPD zeigte keine signifikante Korrelation mit anderen evaluierten Knochenstoffwechselfparametern.

**Tabelle 16.**

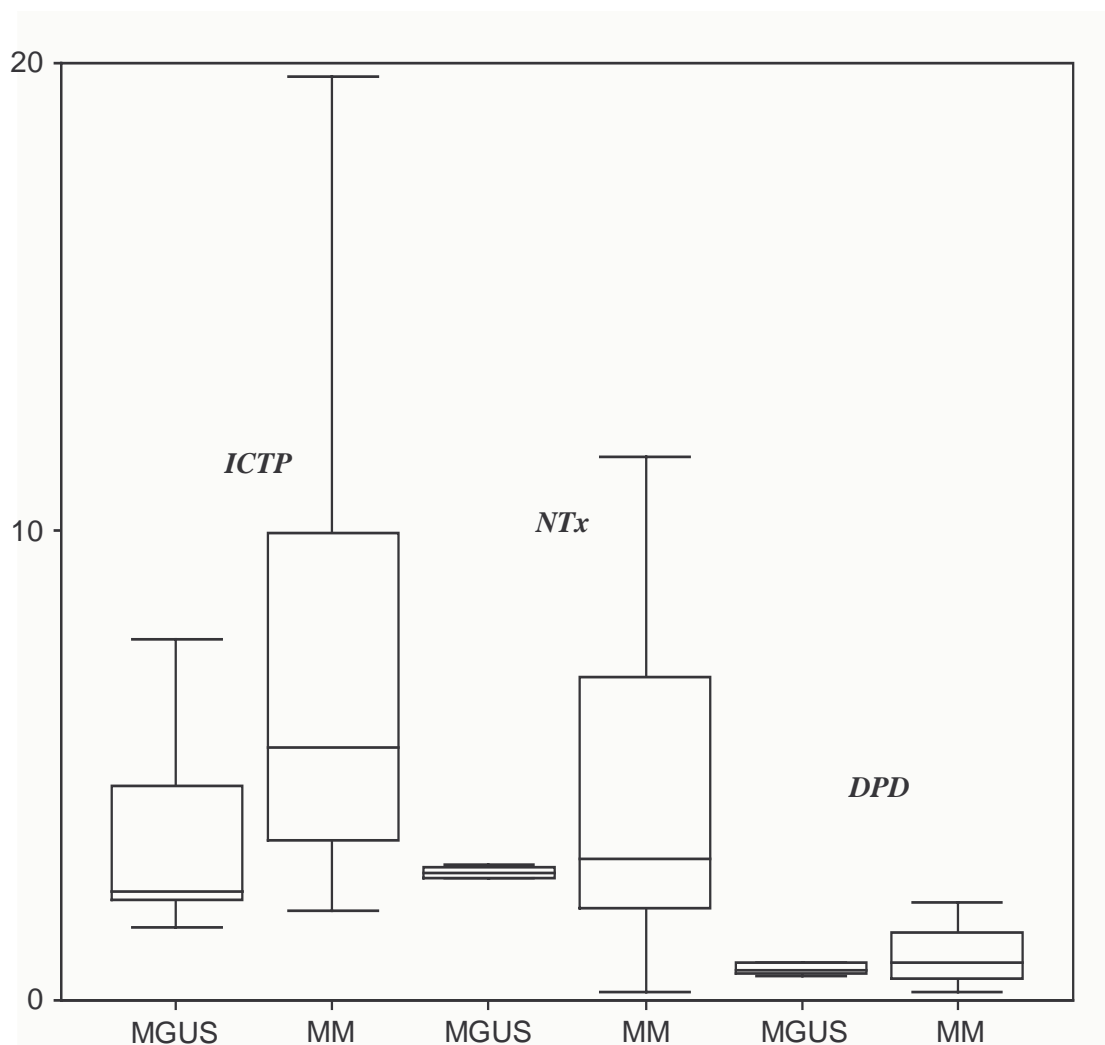
Vergleich der Knochenstoffwechselfparameter ICTP, NTx, DPD, Osteocalcin (OC), knochenspezifische Alkalische Phosphatase (Kn-AP) und der Parameter der Krankheitsaktivität CRP und  $\beta$ 2-Mikroglobulin bei Patienten mit MGUS und multiplem Myelom in verschiedenen Stadien.

	MGUS n=12	Stadium I n=19	Stadium II-III n=41	Kruskal-Wallis-Test <i>P</i>
ICTP [ $\mu$ g/l]	2,34	4,55	6,50	0,002
NTx [nmol/gKrea]	275	234	439	0,129
DPD [nmol/gKrea]	63,00	62,15	83,05	0,764
OC [ $\mu$ g/l]	9,05	10,40	16,00	0,184
Kn-AP [U/l]	38,00	42,00	39,30	0,822
CRP [mg/dl]	0,29	0,31	0,85	0,008
$\beta$ 2-MG [mg/l]	1,50	1,50	2,80	<0,001



**Abbildung 20.**

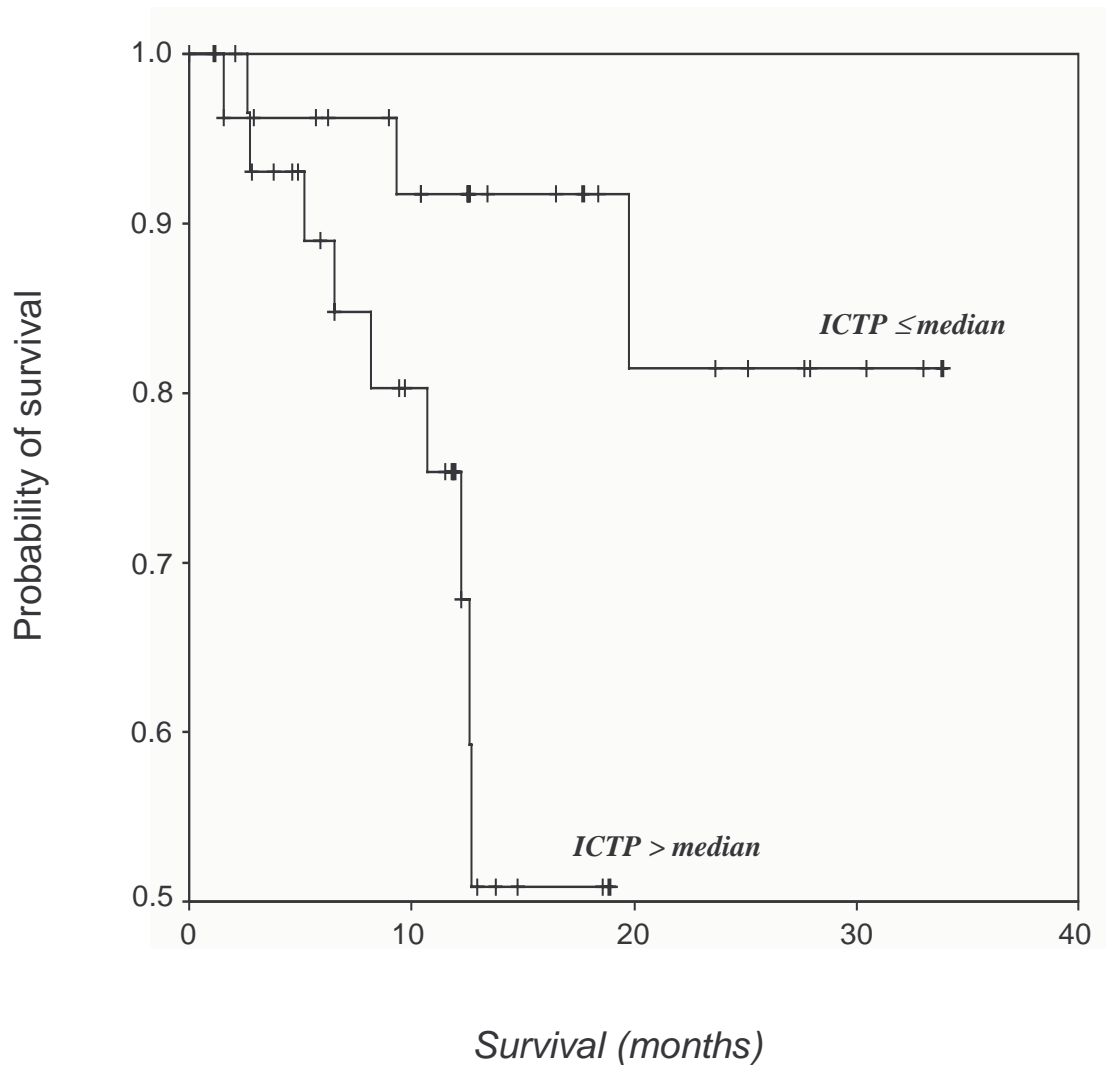
Boxplots zum Vergleich der ICTP-Werte in den Gruppen MGUS (n=12), multiples Myelom (MM) Stadium I (n=19) und multiples Myelom Stadium II-III (n=41).



**Abbildung 21.**

Boxplots zum Vergleich von ICTP, NTx und DPD bei Patienten mit MGUS versus multiplem Myelom (MM) Stadium I-III.

ICTP wurde in  $\mu\text{g/l}$ , NTx in  $100 \times \text{nmol/g}$  Kreatinin und DPD in  $100 \times \text{nmol/g}$  Kreatinin angegeben.



**Abbildung 22.**

Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für Patienten mit multiplem Myelom. Die Patienten wurden nach den ICTP Serumspiegeln vor der Chemotherapie in 2 Gruppen dichotomisiert:  $ICTP \leq \text{Medianwert}$  und  $ICTP > \text{Medianwert}$  ( $P=0,014$ ).

**Tabelle 17.**

Korrelationskoeffizienten zwischen den Knochenstoffwechselfparametern ICTP, NTx, DPD, Osteocalcin (OC), knochenspezifische alkalische Phosphatase (Kn-AP), den Parametern der Krankheitsaktivität CRP und  $\beta$ 2-Mikroglobulin und den Angiogenesefaktoren bFGF, VEGF, HGF und IL-6 bei Patienten mit multiplem Myelom (n=60).

	ICTP	NTx	DPD	OC	Kn-AP	CRP	$\beta$ 2-MG	bFGF	VEGF	HGF	IL-6
	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
ICTP	-	<b>0,461</b>	0,031	0,372	0,137	0,085	<b>0,333</b>	<b>0,319</b>	<b>0,257</b>	<b>0,348</b>	<b>0,300</b>
NTx	<b>0,461</b>	-	0,220	<b>0,711</b>	<b>0,437</b>	-0,135	0,255	0,038	0,102	<b>0,339</b>	-0,055
DPD	0,031	0,220	-	0,074	-0,006	-0,023	-0,087	0,084	-0,071	0,223	0,026
OC	0,372	<b>0,711</b>	0,074	-	0,230	-0,091	0,254	-0,043	0,241	0,213	0,184
Kn-AP	0,137	<b>0,437</b>	-0,006	0,230	-	-0,295	-0,276	0,100	0,155	0,083	-0,211
CRP	0,085	-0,135	-0,023	-0,091	-0,295	-	<b>0,446</b>	0,042	-0,050	0,238	<b>0,498</b>
$\beta$ 2-MG	<b>0,333</b>	0,255	-0,087	0,254	-0,276	<b>0,446</b>	-	0,226	0,076	<b>0,543</b>	<b>0,396</b>
bFGF	<b>0,319</b>	0,038	0,084	-0,043	0,100	0,042	0,226	-	<b>0,381</b>	<b>0,298</b>	0,202
VEGF	<b>0,257</b>	0,102	-0,071	0,241	0,155	-0,050	0,076	<b>0,381</b>	-	<b>0,458</b>	0,044
HGF	<b>0,348</b>	<b>0,339</b>	0,223	0,213	0,083	0,238	<b>0,543</b>	<b>0,298</b>	<b>0,458</b>	-	0,184
IL-6	<b>0,300</b>	-0,005	0,026	0,184	-0,211	<b>0,498</b>	<b>0,396</b>	0,202	0,044	0,184	-

**Tabelle 18.**

Signifikanzniveau der Korrelationen im Spearman-Rank-Test zwischen den Knochenstoffwechselparametern ICTP, NTx, DPD, Osteocalcin (OC), knochenspezifische alkalische Phosphatase (Kn-AP), den Parametern der Krankheitsaktivität CRP und  $\beta$ 2-Mikroglobulin und den Angiogenesefaktoren bFGF, VEGF, HGF und IL-6 bei Patienten mit multiplem Myelom (n=60).

	ICTP	NTx	DPD	OC	Kn-AP	CRP	$\beta$ 2-MG	bFGF	VEGF	HGF	IL-6
	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
ICTP	-	<b>0,001</b>	0,833	0,107	0,382	0,520	<b>0,009</b>	<b>0,013</b>	<b>0,047</b>	<b>0,008</b>	<b>0,023</b>
NTx	<b>0,001</b>	-	0,133	<b>0,004</b>	<b>0,007</b>	0,355	0,077	0,796	0,488	<b>0,018</b>	0,712
DPD	0,833	0,133	-	0,809	0,974	0,875	0,558	0,571	0,632	0,131	0,863
OC	0,107	<b>0,004</b>	0,809	-	0,357	0,703	0,281	0,858	0,306	0,381	0,450
Kn-AP	0,382	<b>0,007</b>	0,974	0,357	-	0,055	0,073	0,525	0,321	0,607	0,186
CRP	0,520	0,355	0,875	0,703	0,055	-	<b>&lt;0,001</b>	0,749	0,702	0,075	<b>&lt;0,001</b>
$\beta$ 2-MG	<b>0,009</b>	0,077	0,558	0,281	0,073	<b>&lt;0,001</b>	-	0,083	0,566	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,002</b>
bFGF	<b>0,013</b>	0,796	0,571	0,858	0,525	0,749	0,083	-	<b>0,003</b>	<b>0,024</b>	0,132
VEGF	<b>0,047</b>	0,488	0,632	0,306	0,321	0,702	0,566	<b>0,003</b>	-	<b>&lt;0,001</b>	0,746
HGF	<b>0,008</b>	<b>0,018</b>	0,131	0,381	0,607	0,075	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,024</b>	<b>&lt;0,001</b>	-	0,172
IL-6	<b>0,023</b>	0,712	0,863	0,450	0,186	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,002</b>	0,132	0,746	0,172	-



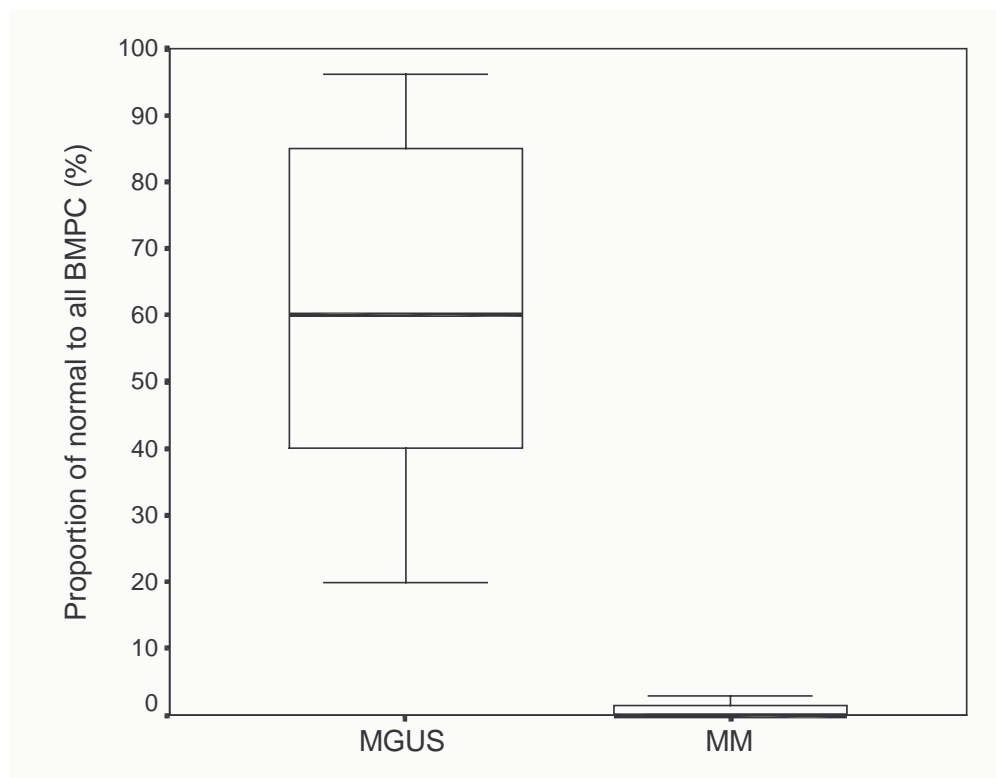
#### **4.10. Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Differenzierung des multiplen Myeloms und der monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz**

In dieser Teilstudie wurde die Frage untersucht, ob durchflußzytometrische Charakteristika von Plasmazellen für die Differenzierung zwischen MGUS und multiplem Myelom herangezogen werden können. Knochenmarkaspirate von 9 gesunden Knochenmarkspendern, 18 Patienten mit MGUS und 49 Myelompatienten wurden analysiert. Stark CD38 exprimierende und CD138 (B-B4) koexprimierende Plasmazellen konnten in allen Fällen charakterisiert werden. Um normale Plasmazellen von atypischen Plasmazellen zu unterscheiden, wurde die Koexpression der Oberflächenantigene CD19 und CD56 analysiert. Plasmazellen normaler Personen waren CD19+/CD56-.

##### **Anteil der phänotypisch normalen Plasmazellen an allen Plasmazellen im Knochenmark**

Bei Myelompatienten waren die Plasmazellen in 36/49 Fällen (73%) CD19-/CD56+ und in 13/49 Fällen (27%) CD19-/CD56-. Die Untersuchungen der intrazellulären Leichtkettenrestriktion zeigten, daß die CD19-/CD56+ und CD19-/CD56- Plasmazellen monoklonal waren. In 92% der Fälle eines multiplen Myeloms war der Anteil der normalen Plasmazellen zu allen Plasmazellen im Knochenmark  $\leq 5\%$ . In 64% der Myelompatienten fanden sich keine phänotypisch normalen Plasmazellen. Im Gegensatz dazu lagen bei allen der 18 MGUS-Patienten zwei verschiedene Subpopulationen von Plasmazellen vor. Die erste Subpopulation zeigte einen normalen Phänotyp (CD19+/CD56-) und betrug zwischen 20-95% (Median 60%) aller Plasmazellen im Knochenmark. Die Analyse der intrazellulären Leichtkettenrestriktion zeigte, daß diese Zellen polyklonal waren. Eine zweite Subpopulation war phänotypisch abnorm: CD19-/CD56+ in 12/18 Fällen (67%) und CD19-/CD56- in 6/18 (33%) der MGUS Patienten. Alle Individuen mit MGUS und keine Patienten mit multiplem Myelom wiesen einen Anteil von  $\geq 20\%$  phänotypisch normalen Plasmazellen von allen Plasmazellen im Knochenmark auf (Abb. 23). Der Anteil der phänotypisch normalen Plasmazellen an allen Plasmazellen im Knochenmark war hochsignifikant für die Differentialdiagnose zwischen multiplem Myelom und MGUS ( $P < 0,0005$ ) und zwar *unabhängig* vom Grad der Knochenmarkinfiltration durch Plasmazellen. In der untersuchten

Gesamtpopulation korrelierte das Verhältnis von normalen zu allen Plasmazellen im Knochenmark signifikant mit Hämoglobin ( $P<0,0005$ ), und invers mit der absoluten Anzahl zirkulierender atypischer Plasmazellen im peripheren Blut ( $P<0,0005$ ) und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin im Serum ( $P<0,0005$ ).

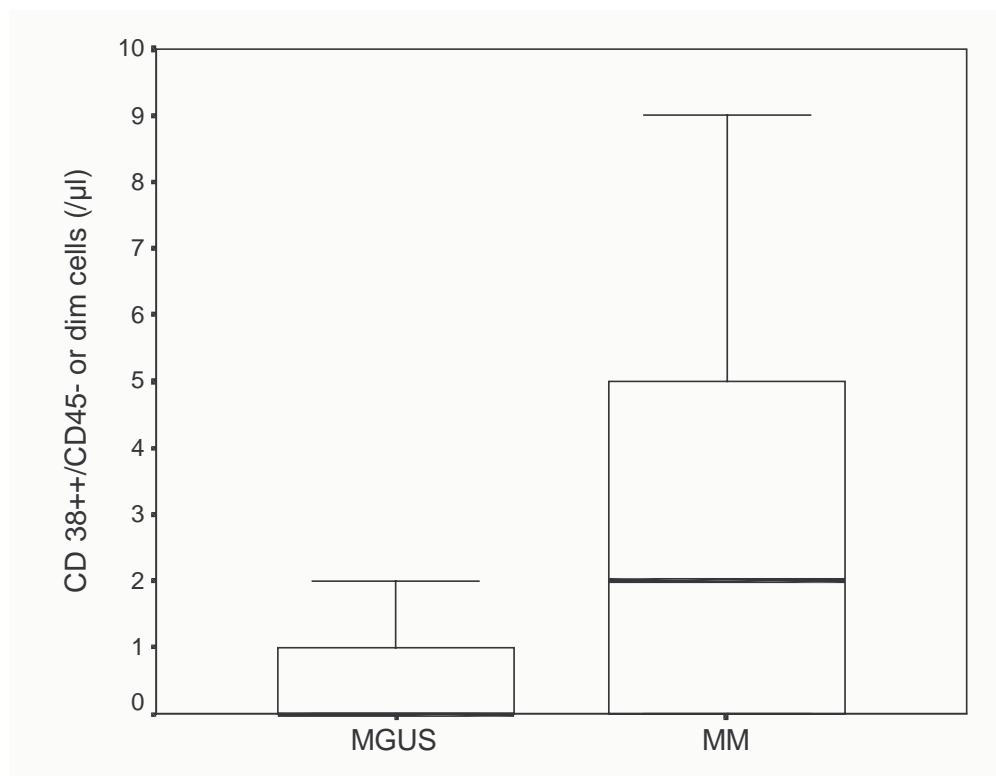


**Abbildung 23.**

Anteil phänotypisch normaler Plasmazellen an allen Plasmazellen im Knochenmark bei MGUS und multiplem Myelom.

### Zirkulierende Plasmazellen im peripheren Blut

Abnorme Plasmazellen (CD38<sup>++</sup>/CD45 dim oder -) konnten im peripheren Blut in 33% aller Individuen mit MGUS und 71% der Myelompatienten gefunden werden. Die maximale Anzahl der phänotypisch abnormen Plasmazellen im peripheren Blut betrug in der MGUS-Gruppe 2/ $\mu$ l (Median 0/ $\mu$ l, Mittelwert 0,4/ $\mu$ l) und in der Myelom-Gruppe 211/ $\mu$ l (Median 2/ $\mu$ l, Mittelwert 16/ $\mu$ l). Keine Person mit MGUS wies  $\geq 3$ / $\mu$ l abnorme Plasmazellen im peripheren Blut auf, jedoch 38% der Patienten mit multiplem Myelom (20% im Stadium I und 41% im Stadium III). Die Anzahl zirkulierender atypischer Plasmazellen war signifikant für die Differentialdiagnose zwischen multiplem Myelom und MGUS ( $P=0,001$ ). In der Gesamtpopulation korrelierte die Anzahl der zirkulierenden abnormen Plasmazellen mit der Knochenmarkinfiltration ( $P<0,0005$ ), dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $P=0,023$ ) sowie invers mit Hämoglobin ( $P=0,004$ ).

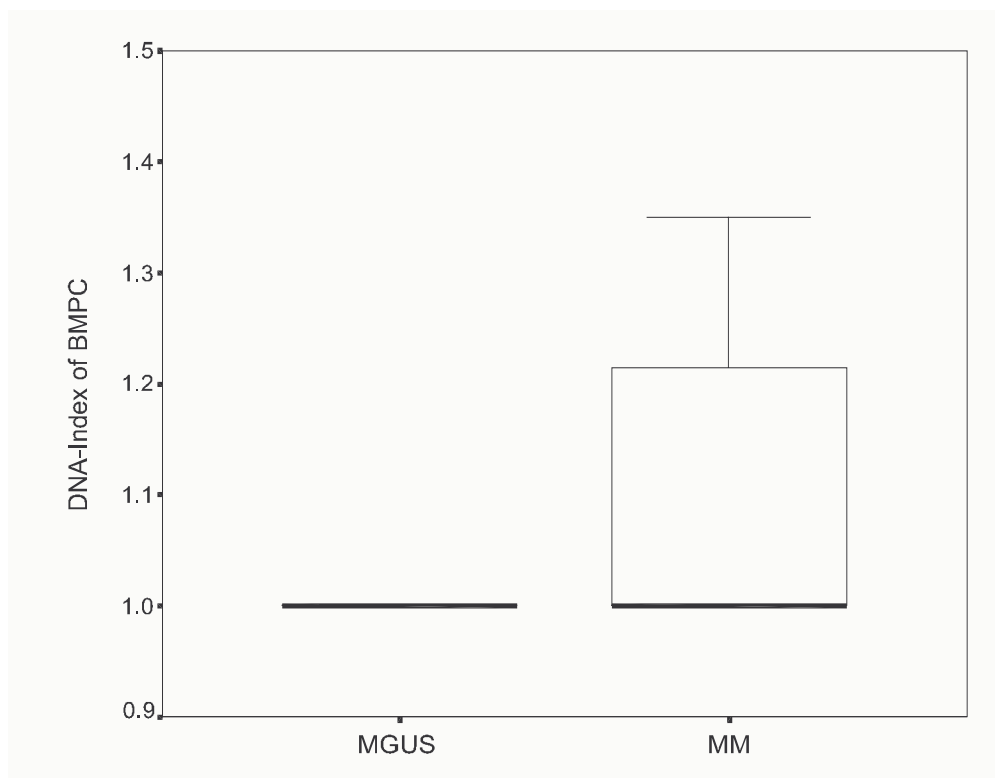


**Abbildung 24.**

Absolute Anzahl zirkulierender atypischer Plasmazellen (CD38<sup>++</sup>/CD45<sup>-</sup>) im peripheren Blut bei MGUS und multiplem Myelom.

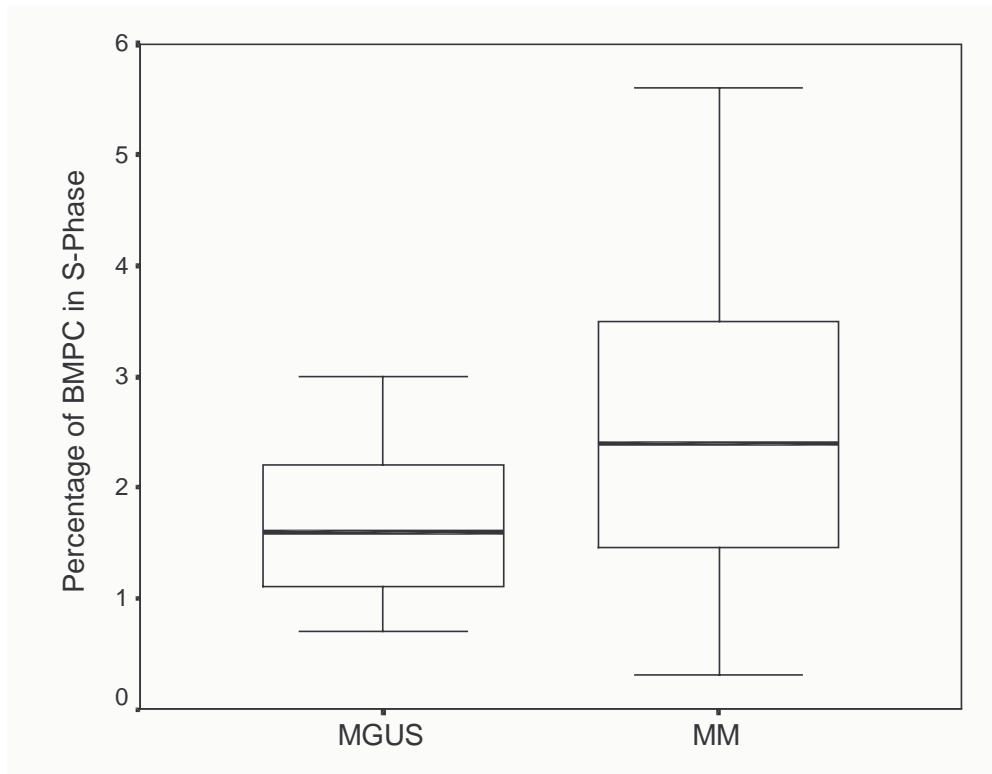
### Aneuploidie und S-Phasen Analyse

Zur Analyse der Ploidie wurde der DNA-Index als Verhältnis von G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Gipfel der Plasmazellen (CD38<sup>++</sup>/CD138<sup>+</sup>) und der übrigen (CD38<sup>-</sup>/dim oder CD138<sup>-</sup>) Zellen, die diploid sind, berechnet. Aneuploidie (DNA-Index <1 oder >1) wurde in 12% der MGUS-Fälle und in 46% der Patienten mit multiplem Myelom festgestellt. Der Prozentsatz der Knochenmarkplasmazellen in der S-Phase betrug in der MGUS-Gruppe zwischen 0,7% - 3% (Median 1,6%). Im Gegensatz dazu wiesen 38% der Myelompatienten einen S-Phasenanteil der Knochenmarkplasmazellen über 3% (0,3-10%, Median 2,4%) auf. Die S-Phasen-Fraktion der Knochenmarkplasmazellen unterschied sich signifikant bei multiplem Myelom und MGUS ( $P=0,035$ ). Der Anteil an Knochenmarkplasmazellen in der S-Phase korrelierte mit dem Grad der Knochenmarkinfiltration ( $P=0,001$ ), dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $P=0,001$ ) und invers mit Hämoglobin ( $P=0,018$ ).



**Abbildung 25.**

DNA Index der Knochenmarkplasmazellen bei MGUS und multiplem Myelom.



**Abbildung 26.**

Prozentsatz der Knochenmarkplasmazellen in der S-Phase bei MGUS und multiplem Myelom.

### **Differenzierung zwischen multiplem Myelom und MGUS**

Unter den durchflußzytometrischen Parametern waren der Anteil der phänotypisch normalen Plasmazellen an allen Plasmazellen im Knochenmark, der DNA-Gehalt und der Prozentsatz der Knochenmarkplasmazellen in der S-Phase sowie die absolute Anzahl zirkulierender atypischer Plasmazellen im peripheren Blut in den beiden Gruppen multiples Myelom und MGUS signifikant unterschiedlich. Unter diesen Parametern kam dem Verhältnis phänotypisch normaler Plasmazellen gegenüber allen Plasmazellen im Knochenmark eine besondere Bedeutung zu, da mit diesem Parameter die Gruppen MGUS und multiples Myelom mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% differenziert werden konnten.

Patienten, bei denen die Differenzierung zwischen einem multiplem Myelom und MGUS mit den herkömmlichen Kriterien nach Durie und Salmon besonders schwierig ist, wurden näher untersucht. Diese Patienten weisen eine Plasmazellinfiltration des Knochenmarks von  $\leq 30\%$  und einen Paraproteingradienten von  $\leq 3,5\text{g/dl}$  IgG bzw.  $\leq 2\text{g/dl}$  IgA auf und haben keine Osteolysen im Röntgen des Skelettsystems. In dieser „Grenzgruppe“ aus 29 Patienten wurden in der vorliegenden Arbeit 2 Gruppen definiert: Gruppe 1 (n=12): Patienten, bei denen der MRT-Befund für ein multiples Myelom sprach oder Patienten, die innerhalb von 18 Monaten durch Progression die diagnostischen Kriterien eines multiplen Myeloms erfüllten, Gruppe 2 (n=17): Patienten, die die Merkmale der Gruppe 1 nicht aufwiesen.

Die Gruppen 1 und 2 zeigten einen signifikanten Unterschied in dem Anteil der immunphänotypisch normalen Plasmazellen an allen Plasmazellen im Knochenmark ( $P < 0,0005$ ). Zwischen den Gruppen 1 und 2 bestand kein signifikanter Unterschied in  $\beta 2$ -Mikroglobulin, CRP sowie der Anzahl zirkulierender Plasmazellen im peripheren Blut. Bei einem Grenzwert von  $\geq 20\%$  phänotypisch normaler Plasmazellen von allen Plasmazellen im Knochenmark konnten die Gruppen 1 und 2 mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% differenziert werden.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Infektiöse Komplikationen der Hochdosistherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation**

Die in dieser Arbeit aufgeführten Daten analysieren erstmals in einer Multivarianzanalyse die determinierenden Faktoren der dokumentierten Infektionen nach einer Hochdosistherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation in einem großen Patientenkollektiv. Die bisher von anderen Autoren publizierten Daten bezogen sich auf wesentlich kleinere Patientenkollektive und beinhalteten meist univariate Analysen einiger weniger Einflußfaktoren (Kolbe et al. 1997, Salazar et al. 1999). Einige Studien, die die infektiösen Probleme nach einer autologen Knochenmarktransplantation analysieren, wurden publiziert (Mossad et al. 1996). Die autologe Knochenmarktransplantation wurde jedoch durch die autologe periphere Stammzelltransplantation weitgehend verdrängt, da bei der letzteren die hämatopoetische Rekonstitution sowohl bei hämatologischen Neoplasien als auch bei soliden Tumoren schneller verläuft (Beyer et al. 1995, Schmitz et al. 1996). Nach den Daten der European Blood and Marrow Transplantation Registry wurden im Jahre 1997 90% der autologen Stammzelltransplantationen als periphere Blutstammzell-transplantation durchgeführt (Gratwohl et al. 1999). Dieser hohe Prozentsatz läßt eine separate Analyse der infektiösen Probleme bei der HDCT mit autologer peripherer Blutstammzelltransplantation angemessen erscheinen.

In die vorliegende Analyse wurden 600 HDCT-Zyklen eingeschlossen. Bei der univariaten Analyse zeigte sich, daß Alter, Krankheitskategorie, Selektion der CD34+ Zellen des Transplantats und das Geschlecht signifikant mit der Rate dokumentierter Infektionen assoziiert waren. Diese Daten stehen im Einklang mit zwei Publikationen unserer Arbeitsgruppe, in denen erstmals der Einfluß der Grundkrankheit auf die Rate der dokumentierten Infektionen gezeigt werden konnte (Sezer et al. 2000a, Sezer et al. 2000b). Der Anstieg der Infektionshäufigkeit mit zunehmendem Alter stellt einen wesentlichen Punkt dar, der die HDCT bei Patienten in höherem Alter über 60 Jahren beeinflußt. Die Zunahme der Infektionen nach Selektion der CD34+ Zellen wurde in univariaten Analysen auch von anderen Gruppen berichtet (Miyamoto et al. 1998, Holmberg et al. 1999).

In der multivariaten Analyse zeigten sich erstmals folgende Parameter als unabhängige Einflußgrößen auf die Rate der dokumentierten Infektionen: Alter des Patienten, Art der Grundkrankheit sowie Zahl der Stammzellen bezogen auf das Körpergewicht. Mit steigender Stammzellzahl/kg verkürzte sich die Dauer der Neutropenie. Ein Optimum fanden wir bei einer Stammzellzahl über  $5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (Sezer et al. 2000k). Andere Gruppen waren bisher nicht in der Lage, in der Multivarianzanalyse die Risikofaktoren für Infektionen nach der HDCT mit autologer PBSCT zu identifizieren (Seropian et al. 1999, Ketterer et al. 1999). Ketterer et al. fanden keine signifikanten prädiktiven Faktoren für Infektionen innerhalb von 30 Tagen nach Transplantation bei Patienten mit lymphoproliferativen Neoplasien (Ketterer et al. 1999). Dies kann an den geringeren Patientenzahlen liegen (Seropian et al. 1999, Ketterer et al. 1999), die in die jeweiligen Untersuchungen eingebracht wurden.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Variablen wurde in einer getrennten Analyse der Einfluß der Mukositis auf die Rate der dokumentierten Infektionen und auf die HDCT-assoziierte Mortalität untersucht. Die HDCT kann schwere Einschränkungen der Mukosafunktion und -regeneration im gesamten Gastrointestinaltrakt hervorrufen. Bei der HDCT stellt sich die Mukositis aus der Sicht des Patienten als eines der wichtigsten Probleme dar, das zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität führt (Sezer et al. 2000l). Darüber hinaus führt Mukositis zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion der Schleimhäute gegen stets präsente pathogene Mikroorganismen der Gastrointestinalflora. Die Analyse der Daten zeigte bei einem großen Kollektiv von Patienten, die mit HDCT und autologer PBSCT behandelt wurden, daß die Dauer der schweren Mukositis sowohl mit dokumentierten Infektionen als auch mit der therapieassoziierten Mortalität signifikant korreliert ist (Sezer et al. 2000e). In einer kürzlich erschienenen Publikation mit 126 HDCT-Zyklen mit autologer PBSCT konnte zwar die Bedeutung der Mukositis für Infektionen gezeigt werden, jedoch konnte eine multivariate Analyse der Determinanten der Mukositis nicht durchgeführt werden, da viele Patienten- und Therapiecharakteristika in diesem Patientenkollektiv stark miteinander korrelierten (Rapoport et al. 1999). In dieser Studie konnte – möglicherweise aufgrund der limitierten Fallzahl – kein signifikanter Zusammenhang zwischen der therapieassoziierten Mortalität und der Mukositis nachgewiesen werden. In unserer Studie konnte anhand einer großen Zahl von HDCT-Zyklen und autologer Stammzellempfänger



erstmalig gezeigt werden, daß die Dauer der schweren Mukositis signifikant mit der therapieassoziierten Mortalität und mit dem Auftreten dokumentierter Infektionen assoziiert ist. Da die schwere Mukositis einen der Hauptgründe für die Mortalität und Morbidität darstellt, wären Strategien zur Reduktion der transplantationsbedingten Mukosatoxizität notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Wert der antimikrobiellen Prophylaxe ebenfalls analysiert. Für keines der üblicherweise eingesetzten Medikamente zur antimikrobiellen Prophylaxe zeigte sich eine Reduktion der Infektionsrate. Dieser Befund ist deswegen bedeutsam, da viele Zentren routinemäßig eine antivirale oder antifungale Prophylaxe nach der autologen Stammzelltransplantation verwenden (Kolbe et al. 1997, Salazar et al. 1999), ohne daß Daten für den Nutzen einer solchen Prophylaxe vorliegen. Die Rate der viralen Infektionen, invasiven Pilzinfektionen und Pneumonien waren in unserer Serie gering. Diese Befunde zeigen im Einklang mit anderen Publikationen, daß das Spektrum der Infektionen nach der HDCT mit autologer Stammzelltransplantation von den Infektionen nach allogener Transplantation abweicht (Bilgrami et al. 1999).

Bakteriämien stellten die häufigste Form der dokumentierten Infektionen nach HDCT mit autologer PBSCT in unserer Analyse dar. Grampositive Bakteriämien machten 82% der mikrobiologisch dokumentierten Infektionen aus. Dieser Befund ist vergleichbar mit den bisher publizierten Daten zu Infektionen nach HDCT mit autologer PBSCT (Offidani et al. 1999, Ketterer et al. 1999). Die häufig als Konsequenz der intensiven Chemotherapie auftretende Mukositis wurde als eine wichtige Eintrittspforte für Streptokokkeninfektionen beschrieben (Ruescher et al. 1998). Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß die bei immunkompromittierten Patienten aus den Blutkulturen isolierten Koagulase-negativen Staphylokokken häufig aus dem Gastrointestinaltrakt stammen (Herwaldt et al. 1992). Es wurde gezeigt, daß durch eine antimikrobielle Prophylaxe (zusätzlich zu einem Gyrasehemmer) mit Rifampicin, einem Medikament mit hoher Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien, die Rate der Infektionen nach der HDCT gesenkt werden kann (Gilbert et al. 1994). Solche prophylaktischen Regime würden jedoch nach HDCT mit autologer PBSCT nur bei Patientenkollektiven mit einer hohen Infektionswahrscheinlichkeit (hämatologische Neoplasien oder erhöhtes Alter oder geringe Stammzellzahl) von potentielltem Nutzen sein

und bedürfen in einem solchen Kollektiv einer prospektiv randomisierten Überprüfung.

## **5.2. Angiogenese bei malignen Neoplasien**

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß die Angiogenese einen wichtigen Faktor für die Progression, Invasion und Metastasierung von soliden Tumoren darstellt (Folkman 1995, Folkman 1996). Die Relevanz der Angiogenese wurde bei soliden Tumoren bereits gut untersucht. Sie stellt bei einer Vielzahl von soliden Tumoren einen wichtigen Prognosefaktor dar. Bei Neoplasien der Mamma, der Harnblase, beim kolorektalen Karzinom und beim malignen Melanom wurde gezeigt, daß die erhöhte Angiogenese mit der Metastasierung, kürzerem progressionsfreien Überleben und kürzerer Überlebenszeit korreliert (Weidner et al. 1991, Folkman und Shing 1992, Graham et al. 1994, Acenero et al. 1998, Chaudhary et al. 1999, Gallego et al. 2000). Als ein Schlüsselprozeß beim malignen Wachstum, kann die Initiierung des sogenannten „angiogenic switch“ als Folge eines neu entstanden Ungleichgewichts zwischen stimulierenden und inhibierenden angiogenetischen Faktoren betrachtet werden (Hanahan et al. 1996). Verschiedene angiogenetische Zytokine wie VEGF, bFGF und HGF sind bereits hinreichend als Zytokine mit angiogenetischer Wirkung charakterisiert worden (Folkman und Klagsburn 1987, Schweigerer et al. 1987, Bussolino et al. 1992).

Es gibt zunehmende Hinweise dafür, daß die Angiogenese im Knochenmark bei hämatologischen Neoplasien einen relevanten pathogenetischen Mechanismus darstellt (Perez-Atayde et al. 1997, Foss et al. 1997, Vacca et al. 1999a). Eine gesteigerte Angiogenese wurde bei Patienten mit akuten und chronischen Leukämien und myelodysplastischen Syndromen kürzlich publiziert (Aguayo et al. 2000a). Als Maß der Angiogenese wird die Mikrogefäßdichte (microvessel density, MVD) im Tumorpräparat nach immunhistochemischer Darstellung der Endothelien herangezogen. Aktuelle Ergebnisse zeigen, daß der Angiogenese und der Expression von angiogenetischen Zytokinen nicht nur bei soliden Tumoren, sondern auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen eine wesentliche Bedeutung zukommen kann.

Die ersten Publikationen über angiogenetisch wirksame Faktoren bei hämatologischen Erkrankungen erfolgten bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). In Lymphombiopsaten zeigte sich eine VEGF-Expression (Foss et al. 1997). Die prognostische Bedeutung der Zytokine bFGF und VEGF bei NHL wurde in zwei Publikationen gezeigt (Bertolini et al. 1999, Salven et al. 1997b). So berichteten Salven et al., daß eine erhöhte VEGF-Konzentration im Serum bei Patienten mit NHL mit einem schlechten Therapieansprechen assoziiert ist (Salven et al. 1997b). Eine Serumkonzentration des VEGF oberhalb des Medians war mit einer reduzierten körperlichen Leistung, einem ungünstigen prognostischen Index, erhöhten Serum-LDH-Werten und dem histologischen Bild eines großzelligen NHL assoziiert. Bertolini et al. untersuchten bei 36 NHL-Patienten die Bedeutung von Angiogenesefaktoren (Bertolini et al. 1999). Sie konnten zeigen, daß bei Patienten mit VEGF- und bFGF- Konzentrationen unterhalb des Medians das ereignisfreie Überleben (EFS) signifikant länger war. Ribatti et al. fanden eine erhöhte MVD in Lymphknoten von 88 Patienten mit B-NHL (Ribatti et al. 1996). Bei NHL-Patienten zeigte sich eine signifikant erhöhte Angiogenese im Vergleich zu Patienten mit benignen Lymphadenopathien. Das Ausmaß der MVD und die Makrophagen-Dichte im Knochenmark stieg parallel zu der Progression der Erkrankung an (Vacca et al. 1999b).

Kini et al. gelang der Nachweis einer vermehrten MVD in Knochenmarkbiopsien von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) im Vergleich zu Kontrollpersonen (Kini et al. 2000). Darüber hinaus korrelierte die MVD positiv mit dem Stadium der Erkrankung. In einer anderen aktuellen Arbeit konnte bei Patienten mit CLL allerdings keine erhöhte MVD demonstriert werden (Aguayo et al. 2000a). Von prognostischem Wert scheint bei der CLL das Zytokin VEGF zu sein. Die intrazelluläre VEGF-Konzentration (Aguayo et al. 2000b) und der VEGF-Spiegel im Serum (Molica et al. 1999) stellten sich als Prognosefaktoren für die Gesamtüberlebenszeit heraus. Erhöhte Serum VEGF-Konzentrationen im frühen Stadium der CLL waren zudem mit dem Risiko einer frühen Progression der Erkrankung assoziiert. Es wurde gezeigt, daß CLL-Zellen auch bFGF produzieren und die intrazelluläre bFGF-Konzentration einen prädiktiven Faktor für das Therapieansprechen darstellen kann (Menzel et al. 1996).

Bei der akuten lymphatischen Leukämie fand sich bei Kindern eine erhöhte MVD und eine

vermehrte Ausscheidung von bFGF im Urin (Perez-Atayde et al. 1997, Nguyen et al. 1994). Bereits vor einigen Jahren wurde berichtet, daß AML-Zellen VEGF exprimieren (Fiedler et al. 1997). Kürzlich wurde die prognostische Relevanz der intrazellulären Konzentration des VEGF bei der AML gezeigt (Aguayo et al. 1999). Auch die Expression von bFGF konnte in AML-Zellen nachgewiesen werden, hier ist jedoch die prognostische Bedeutung unklar (Hussong et al. 2000). Hinsichtlich der MVD im Knochenmark stellten sich signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und AML-Patienten dar (Hussong et al. 2000). Zudem konnte eine Korrelation zwischen der MVD und dem Anteil der Myeloblasten im Knochenmark festgestellt werden. Weiterhin wurde über eine signifikante Abnahme der MVD im Rahmen einer effektiven Induktionstherapie berichtet (Padró et al. 2000). So konnte am Tag 16 der Induktionstherapie bei den Patienten, die keine Restinfiltration mehr aufwiesen, eine Reduktion der MVD von 60% verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich nur eine geringfügige Veränderung der MVD bei Patienten mit einer Restinfiltration im Knochenmark. Pruneri et al. untersuchten die MVD und die Expression von VEGF im Knochenmark von Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS) (Pruneri et al. 1999). Insbesondere zeigten Patienten mit refraktärer Anämie mit Blastenexzeß in Transformation (RAEB-T) und Patienten mit chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) eine hohe MVD. Auch bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) fand sich eine erhöhte Plasma-Konzentration von VEGF, bFGF, HGF und TNF- $\alpha$  (Aguayo et al. 2000a).

In Myelomzelllinien und in Plasmazellen aus dem Knochenmark von Patienten mit multiplem Myelom wurde die Expression von VEGF nachgewiesen (Bellamy et al. 1999). Der niedrig-affine Rezeptor für bFGF, das Syndecan-1 (CD 138) wurde auf der Oberfläche von Myelomzellen und anderer maligner B-Zellen (Witzig et al. 1998) identifiziert. Ihm wird eine regulatorische Funktion beim Wachstum von Myelomzellen zugeschrieben (Dhodapkar et al. 1998a). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde der Serumspiegel der löslichen Form des Syndecan-1 bei Myelompatienten als ein unabhängiger prognostischer Faktor beschrieben (Seidel et al. 2000). Ein weiterer angiogenetischer Faktor, das HGF, wurde ebenfalls als angiogenetisch wirksames Zytokin identifiziert (Bussolino et al. 1992) und spielt darüber hinaus eine entscheidende Rolle bei der Auflösung von Zellkontakten („tight junctions“) während der Zellinvasion von Tumorzellen (Stoker et al. 1987). Aufgrund dieser Eigenschaft

wird HGF auch als „scatter Faktor“ bezeichnet. Das HGF Rezeptorprotein wird durch das Protoonkogen c-met (Bottaro et al. 1991) kodiert und wurde auf der Zelloberfläche von Myelomzelllinien nachgewiesen (Borset et al. 1996). Bei einer Untergruppe von Patienten mit multiplem Myelom wurde HGF kürzlich als prognostischer Faktor beschrieben (Seidel et al. 1998). Zusätzlich zu den genannten angiogenetischen Zytokinen könnte auch IL-6, das einen Wachstumsfaktor für Myelomzellen darstellt, an der Aktivierung von angiogenetischen Prozessen beim multiplen Myelom beteiligt sein (Dankbar et al. 2000).

### **5.3. Prognostische Relevanz der Angiogenese für die Überlebenszeit beim multiplen Myelom**

Im Vergleich zu soliden Tumoren stehen bei hämatologischen Neoplasien weniger Daten über die Angiogenese zur Verfügung. Untersuchungen zur Relevanz der Angiogenese wurden bei malignen hämatologischen Erkrankungen erst kürzlich initiiert, obwohl in einer Publikation von Vacca et al. eine erhöhte Angiogenese im Knochenmark von Patienten mit multiplem Myelom bereits 1994 demonstriert werden konnte (Vacca et al. 1994). In der aktuellen Untersuchung wandten wir uns der Frage zu, ob die Angiogenese beim multiplem Myelom eine prognostische Relevanz besitzt. In einem unvorbehandelten Patientenkollektiv mit multiplem Myelom fanden wir für Patienten mit hoher bzw. niedriger MVD einen signifikanten Unterschied in der krankheitsbezogenen Überlebenszeit (Sezer et al. 2000h). Die prognostische Relevanz der Angiogenese beim multiplen Myelom wurde darüber hinaus in der multivariaten Analyse bei zusätzlichem Einschluß der bereits etablierten Prognosefaktoren  $\beta$ 2-Mikroglobulin, CRP und Alter bestätigt. Bekanntlich stellt der prozentuale Anteil der Plasmazellen im Knochenmark beim multiplen Myelom keinen Prognosefaktor für das Überleben dar, so daß der Grad der Plasmazellinfiltration bei dieser Multivarianzanalyse nicht berücksichtigt wurde.

Unsere Daten stimmen mit den preliminären Daten von Munshi et al., die in Abstractform vorgestellt wurden, prinzipiell überein (Munshi et al. 1998). Allerdings erhielten die in dieser Studie untersuchten Patienten alle eine Tandem-Hochdosischemotherapie gefolgt von einer autologen peripheren Stammzelltransplantation. Unsere Ergebnisse zeigen zum ersten Mal,

daß die MVD einen neuen, unabhängigen Prognosefaktor für das Überleben von Patienten mit multiplem Myelom darstellt und zwar unabhängig von der Art der Chemotherapie. Auch bei Patienten, die einer konventionell-dosierten Chemotherapie zugeführt wurden, unterstreichen unsere Ergebnisse die Relevanz der Angiogenese beim Myelom.

#### **5.4. Veränderungen der Angiogenese unter Chemotherapie beim multiplen Myelom**

In dieser Arbeit analysierten wir die Chemotherapie-induzierten Veränderungen der Angiogenese im Knochenmark von Myelom-Patienten. Wir fanden als erste Arbeitsgruppe heraus, daß Patienten mit multiplem Myelom, die eine Remission nach der Chemotherapie erreichten, einen signifikanten Abfall der MVD im Vergleich zu der MVD vor der Therapie zeigen. Andererseits zeigte sich bei den Nicht-Ansprechern keine signifikante Veränderung der MVD. Das progressionsfreie Überleben der Patienten, bei denen nach der Chemotherapie eine Reduktion der MVD zu verzeichnen war, stellte sich als signifikant länger als bei Patienten ohne eine Reduktion der MVD heraus (Sezer et al. 2001b). Darüber hinaus verglichen wir die MVD der Patienten zum Zeitpunkt der Remission mit der MVD von unbehandelten Patienten im Stadium I. Obwohl die MVD der Patienten im Stadium II/III vor der Chemotherapie signifikant höher war als bei den Patienten im Stadium I, konnten wir zum ersten Mal berichten, daß sich die MVD der Patienten nach Erreichen einer Remission nicht mehr von der MVD im Stadium I unterschied (Sezer et al. 2000j).

Diese Ergebnisse zeigen Parallelen zu denen von Padró et al. bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (Padró et al. 2000). Eine erhöhte Angiogenese im Knochenmark wurde kürzlich bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie berichtet (Hussong et al. 2000). In einer anderen Studie wurde ebenfalls eine signifikant erhöhte MVD bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie beschrieben (Padró et al. 2000). In dieser Publikation zeigte sich am Tag 16 der Induktionschemotherapie in den Kontrollbiopsien ohne eine Restinfiltration durch Blasten eine um 60% reduzierte MVD im Vergleich zu den initialen Biopsien. Im Gegensatz dazu fand sich nur eine 17%ige Reduktion bei den Patienten mit einer Restinfiltration von  $\geq 5\%$  Blasten. Die MVD der Knochenmarkbiopsien der AML-Patienten,

die auf die Therapie ansprachen, lag im selben Bereich wie die MVD der Knochenmarkbiopsien von Patienten ohne einen Knochenmarkbefall, die eine andere Erkrankung als AML hatten.

Es liegt bisher nur eine einzige Publikation vor, in der die Veränderung der MVD nach der Chemotherapie beim multiplen Myelom untersucht wurde. In dieser Studie wurde die MVD bei 13 Patienten mit multiplen Myelom untersucht (Rajkumar et al. 1999b). Alle Patienten wurden mit einer Hochdosischemotherapie und Stammzelltransplantation behandelt. In dieser Arbeit konnte keine signifikante Veränderung der MVD zum Zeitpunkt der kompletten oder partiellen Remission im Vergleich zu den Werten vor Beginn der Hochdosischemotherapie gezeigt werden. Im Gegensatz dazu demonstrieren unsere Ergebnisse einen signifikanten Abfall der MVD bei Patienten mit Remission, unabhängig von der Art der durchgeführten Chemotherapie. Der unterschiedliche Zeitpunkt der Knochenmarkbiopsien und damit der MVD-Messungen ist eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede: Wir hatten Biopsien vor dem Beginn und nach dem Ende der gesamten Chemotherapieepisode miteinander verglichen, Rajkumar et al. jedoch Biopsien vor und nach der Hochdosistherapie. Wichtiger dürfte jedoch folgender Punkt sein: In unserer Studie wurde die Hochdosischemotherapie bei wenig vorbehandelten Patienten und bei „sensitiver“ Erkrankung durchgeführt. Im Gegensatz dazu waren alle Patienten in der Untersuchung von Rajkumar et al. (Rajkumar et al. 1999b) massiv vorbehandelt und erhielten eine Hochdosischemotherapie zum Zeitpunkt der refraktären Erkrankung oder des Rezidivs. Innerhalb der 13 untersuchten Patienten in deren Studie befanden sich sieben Patienten mit einem Rezidiv nach konventioneller Chemotherapie und zwei Patienten wiesen ein primär refraktäres Myelom auf. Eine Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation bei neu diagnostiziertem Myelom auf der einen Seite und nach langer Vorbehandlung rezidivierter bzw. refraktärer Erkrankung auf der anderen Seite ist jedoch mit Unterschieden im anti-Myelom Effekt, in der Krankheitskontrolle und auch in der Überlebenswahrscheinlichkeit nach der Transplantation vergesellschaftet (Barlogie et al. 1999, Rajkumar et al. 1999a). Im Gegensatz zu einer frühzeitigen Hochdosischemotherapie innerhalb der ersten 12 Monate der zytostatischen Behandlung kann durch eine autologe Transplantation bei Patienten mit rezidivierter Erkrankung nach konventioneller Chemotherapie keine Plateauphase erreicht werden (Barlogie et al. 1999, Desikan et al. 2000, Rajkumar et al. 1999a). Die Resultate der



Studie von Rajkumar et al. (Rajkumar et al. 1999b) können deswegen nicht für alle Patienten mit multiplem Myelom verallgemeinert werden. In dieser Studie könnte die Persistenz der Angiogenese nach der Hochdosismethotherapie eine kontinuierliche angiogenetische Stimulation der endothelialen Zellen durch verbliebene Myelomzellen widerspiegeln, da bei diesen Patienten residuelle Myelomzellen erwartet werden müssen, auch wenn die Patienten eine klinische Remission erreichen, da die resultierende Remissionszeit kurz ist (Rajkumar et al. 1999a).

Unsere Ergebnisse verdeutlichen, daß die MVD beim multiplen Myelom nicht nur einen Prognosefaktor für das Überleben darstellt, sondern daß die Reduktion der MVD als prognostischer Parameter das progressionsfreie Überleben widerspiegelt, und unterstreichen somit die Bedeutung der Angiogenese bei dieser Erkrankung.

#### **5.5. Korrelation zwischen der Angiogenese und der Plasmazellinfiltration sowie dem Serum $\beta$ 2-Mikroglobulin**

Bei Patienten mit multiplem Myelom wurde bereits eine Erhöhung der Angiogenese beschrieben. Als Maß für die Angiogenese in Knochenmarkbiopsien von Patienten mit multiplem Myelom und MGUS beurteilten Vacca et al. in immunhistochemischen Präparaten die Fläche, die von Kapillaren bedeckt war und bezeichneten diese Fläche als „microvessel area“ (Vacca et al. 1994). Vacca et al. teilten das Patientenkollektiv – unabhängig von der Stadieneinteilung von Salmon & Durie – in zwei Gruppen auf: Patienten mit aktivem und nicht-aktivem multiplen Myelom. Patienten mit aktiver Erkrankung wurden als solche definiert, die symptomatisch erschienen und bei denen ein Anstieg des monoklonalen Proteins zu verzeichnen war sowie Patienten, die ein Rezidiv entwickelten. Die Angiogenese im Knochenmark stieg mit der Aktivität der Erkrankung an und korrelierte mit dem Anteil der Plasmazellen in der Synthesephase, beurteilt nach dem Plasmazell-Labeling-Index. In deren Studie konnte eine Beziehung zwischen der „microvessel area“ und der Plasmazellinfiltration nicht demonstriert werden.

Im Gegensatz dazu berichteten Munshi et al. in Abstractform über eine Korrelation zwischen



der MVD und dem Grad der Plasmazellinfiltration bei 36 Patienten mit neu diagnostiziertem multiplem Myelom (Munshi et al. 1998). In einem anderen Abstract wurde bei Patienten mit multiplem Myelom und MGUS über eine positive Korrelation zwischen der Plasmazellinfiltration im Knochenmark und der VEGF-Expression sowie der Angiogenese berichtet (Sjak-Shie et al. 1999). In einer bereits publizierten Studie, die allerdings nur rezidierte Patienten vor einer erneuten Behandlung untersuchte, korrelierte die MVD im Knochenmark mit der Plasmazellinfiltration (Singhal et al. 1999).

Aufgrund dieser widersprüchlichen, teilweise preliminären Ergebnisse hinsichtlich der Beziehung zwischen der MVD und der Plasmazellinfiltration, untersuchten wir diese Relation in Knochenmarkbiopsien von Patienten mit multiplem Myelom sowohl vor als auch nach einer Chemotherapie. Wir konnten in unserer Studie zeigen, daß die MVD im Stadium II-III im Vergleich zum Stadium I signifikant erhöht ist. Bei Patienten, die vor einer Chemotherapie evaluiert wurden, fand sich eine signifikante Korrelation zwischen der Angiogenese und dem Grad der Plasmazellinfiltration im Knochenmark sowie der  $\beta$ 2-MG-Konzentration im Serum. Im Gegensatz zu den Ergebnissen vor der Behandlung, konnte nach einer erfolgten Chemotherapie keine Korrelation der Angiogenese mit der Plasmazellinfiltration oder der  $\beta$ 2-MG-Konzentration gefunden werden. Diese Resultate lassen vermuten, daß der Abfall der MVD durch eine Chemotherapie sowohl das Resultat des Anti-Myelom-Effekts der zytostatischen Behandlung als auch eines direkten toxischen Effekts der Chemotherapeutika auf endotheliale Zellen darstellt.

## **5.6. Angiogenetisch wirksame Zytokine beim multiplen Myelom**

Aus Untersuchungen bei soliden Tumoren ist bekannt, daß VEGF, bFGF und HGF bei der Angiogenese eine wesentliche Rolle spielen (Nguyen et al. 1994, Taniguchi et al. 1995). Die Fähigkeit von Myelomzellen, die Neubildung von Gefäßen zu induzieren, wurde bereits an Chorionmembranen von Hühnerembryonen sowie in einem Proliferationsassay mit Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen gezeigt (Vacca et al. 1999a). Die Beteiligung von bFGF an der Gefäßneubildung konnte indirekt durch die Hemmung der plasmazellinduzierten Angiogenese mittels polyklonaler anti-bFGF Antikörper, ebenfalls an

Chorionmembranen von Hühnerembryonen, demonstriert werden (Vacca et al. 1999a). In der vorliegenden Arbeit analysierten wir die Serumspiegel von bFGF von Kontrollpersonen, Individuen mit MGUS und Patienten mit multiplem Myelom. Wir konnten erstmals zeigen, daß Myelompatienten signifikant höhere bFGF Serumspiegel aufweisen als Kontrollpersonen und daß sich die bFGF-Werte vor einer Chemotherapie in den verschiedenen Stadien der Erkrankung signifikant unterscheiden. Weiterhin analysierten wir die Serumkonzentrationen der angiogenetischen Faktoren nach Kategorisierung in die Gruppen multiples Myelom Stadium I versus Stadium II/III, also behandlungsbedürftige Stadien. Die Serumspiegel für bFGF waren in den Stadien II/III signifikant höher als im Stadium I. Nach diesem Befund geht die Zunahme der bFGF-Konzentration mit der Progression des multiplen Myeloms einher. In dem chemotherapierten Patientenkollektiv konnten wir zum ersten Mal zeigen, daß bFGF in der Gruppe der Patienten, die auf die Therapie ansprechen, signifikant abfällt, während dies für die Gruppe der Nicht-Ansprecher nicht der Fall ist (Sezer et al. 2000g).

Innerhalb der komplexen Zytokinkaskade, die schließlich zur Gefäßneubildung führt, könnten beim multiplen Myelom jedoch auch andere Zytokine als bFGF beteiligt sein. Für das VEGF konnte gezeigt werden, daß es von Myelomzellen freigesetzt wird (Bellamy et al. 1999). Ein Anstieg der VEGF Serumspiegel parallel zum Stadium der Erkrankung, wie dies für bFGF der Fall war, lag jedoch nicht vor. Wegen der möglichen Freisetzung von VEGF aus Thrombozyten während der Blutgerinnung wurde von Banks et al. die Verwendung von plättchenarmem Citratplasma für die Messung von VEGF empfohlen (Banks et al. 1998). Da nicht von allen Patienten unseres Kollektivs Plasmaproben zur Verfügung standen, wurden alle Zytokinmessungen einschließlich VEGF im Serum durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Werte sicherzustellen (Sezer et al. 2001a). Allerdings konnte in der Studie von Banks et al. keine signifikante Korrelation zwischen den VEGF-Serumwerten und den Thrombozytenzahlen in der Blutprobe ermittelt werden. Die Relevanz der VEGF-Freisetzung aus Plättchen für Messungen bei Tumorpatienten wird kontrovers diskutiert, unter anderem deswegen, da Studien bei einer Reihe von malignen Erkrankungen eine signifikante Beziehung von Serum-VEGF-Werten mit dem angiogenetischen Potential, dem Tumorwachstum (Dirix Ann Oncol 1996), dem Ansprechen auf die Chemotherapie (Dirix et al. 1997, Salven et al. 1998) und dem Überleben (Salven et al. 1997b, Salven et al. 1998) gezeigt haben. Einige Autoren folgerten sogar, daß für Analysen von VEGF-Spiegeln bei Patienten mit malignen

Erkrankungen Serum geeigneter als Plasma sei (Vermeulen et al. 1999).

Ein weiterer wichtiger angiogenetisch wirksamer Faktor bei malignen Neoplasien ist HGF. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte bei 29 Myelompatienten, die auf eine Chemotherapie ansprachen, ein Abfall der Serum-HGF-Konzentration im Vergleich zu den Werten vor der Therapie verzeichnet werden (Seidel et al. 1998). In unserer Untersuchung konnten wir ebenfalls einen signifikanten Abfall der HGF-Werte im Serum von Patienten, die eine Remission nach der Chemotherapie erreichten, beobachten. Darüber hinausgehend zeigen unsere Untersuchungen, daß der Rückgang der HGF-Konzentration nach der Chemotherapie bei Patienten, die keine Remission erreichen, ausbleibt. Somit zeigen unsere Daten eine signifikante Beziehung zwischen dem Erreichen einer Remission nach der Chemotherapie und dem Abfall der Konzentration der angiogenetischen Zytokine bFGF, VEGF und HGF im Serum. Ob die Reduktion der bFGF-, VEGF- und HGF-Expression der Myelomzellen für das Erreichen einer Remission ursächlich verantwortlich ist oder die Reduktion der Myelommasse mit einem Abfall der Zytokinbildung einhergeht, ist Inhalt weiterer Untersuchungen.

Weiterhin konnten wir eine signifikante Korrelation von bFGF mit VEGF und HGF ermitteln. Kürzlich wurde demonstriert, daß die Exposition der Stromazellen mit rekombinantem humanen VEGF einen Anstieg des Interleukin-6 induziert. Umgekehrt stimulierte IL-6 die VEGF-Expression und -Sekretion von Myelomzellen (Dankbar et al. 2000). Für das IL-6 konnten wir jedoch in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation mit einem der untersuchten angiogenetischen Faktoren feststellen. Wir fanden weder einen signifikanten Anstieg der IL-6-Werte parallel zum Stadium der Erkrankung, noch einen signifikanten Abfall bei Patienten, die erfolgreich chemotherapiert wurden. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte ebenfalls keine prognostische Bedeutung der Serum-IL-6-Konzentration ermittelt werden (Schaar et al. 1999). Unsere Untersuchungen zeigen zum ersten Mal, daß das Erreichen einer Remission nach Chemotherapie beim multiplen Myelom von einem Abfall der Serumkonzentration der angiogenetischen Faktoren bFGF, VEGF und HGF begleitet ist.

## 5.7. Möglichkeiten der Beeinflussung der Angiogenese

Die von uns festgestellte Reduktion der MVD nach der Chemotherapie beim multiplen Myelom dürfte über zwei Mechanismen zustande kommen: einerseits durch eine Reduktion der Freisetzung von Angiogenesefaktoren von Myelomzellen und andererseits durch einen direkten toxischen Effekt der Chemotherapie auf die endothelialen Zellen. Die prognostische Relevanz der Angiogenese beim multiplen Myelom läßt vermuten, daß anti-angiogenetisch wirksame Substanzen eine neue Therapiestrategie für die Behandlung des multiplen Myeloms darstellen könnten. Dieses Therapieprinzip würde einen neuen Angriffspunkt auch bei Patienten, die auf die zytostatische Therapie nicht mehr ansprechen, darstellen. Außerdem hat dieser Ansatz gegenüber der zytostatischen Therapie den Vorzug, daß die Zielzellen keine Tumorzellen sind, die eine hohe Spontanmutationsrate aufweisen und somit zur Entwicklung einer Chemotherapieresistenz neigen, sondern genetisch stabilere Endothelzellen ohne Neigung zu Spontanmutationen und Resistenzentwicklung (Deplanque und Harris 2000). Kürzlich veröffentlichte Studien mit Thalidomid, das eine antiangiogenetische Wirkung besitzt, konnten die Aktivität dieses Medikaments bei chemotherapierefraktären Patienten mit multiplen Myelom zeigen (Singhal et al. 1999). Zur Zeit werden Kombinationen von Thalidomid mit Zytostatika beim multiplen Myelom in Studien eingesetzt. Erste Ergebnisse zeigen bereits ermutigende Ansprechraten bei sonst refraktären Myelompatienten (Munshi et al. 1999, Weber et al. 1999).

Zur Inhibition der Angiogenese befinden sich zur Zeit auch spezifischere Ansätze als Thalidomid, das eine Reihe von Wirkungen und Nebenwirkungen aufweist, in der Erprobung. Unsere klinischen Daten zu bFGF, VEGF und HGF von Myelompatienten legen nahe, nach spezifischen Inhibitoren dieser angiogenetischen Modulatoren zu suchen und deren mögliche Anwendbarkeit in der Behandlung des multiplen Myeloms zu untersuchen. Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Daten haben wir *in vitro* Untersuchungen an humanen Myelomzelllinien und an isolierten Myelomzellen von Patienten mit der Zielsetzung initiiert, die Synthese angiogenetischer Zytokine in Myelomzellen zu inhibieren.

## **5.8. Knochenresorption beim multiplen Myelom**

Die Induktion von osteolytischen Läsionen stellt eines der wichtigsten Charakteristika von malignen Plasmazellen dar. Im Gegensatz zum multiplen Myelom kommt es bei anderen B-Zell-Neoplasien, unabhängig vom Knochenmarkbefall, nur selten zu einer Knochenbeteiligung. Die Knochenresorption kann beim multiplen Myelom zu Schmerzen, Frakturen, zu einer Einschränkung der Beweglichkeit sowie zur Hyperkalzämie führen und ist aus diesem Grunde für den Verlauf der Erkrankung und für die Lebensqualität der Patienten von entscheidender Bedeutung (Sezer et al. 1999c). Bei ungefähr 10% der Patienten erscheint die Knochenresorption als diffuse Osteopenie ohne Nachweis lokalisierter Osteolysen. Nur bei sehr wenigen Patienten mit multiplen Myelom bleibt im Verlauf der Erkrankung die Entwicklung von osteolytischen Läsionen aus (Bataille et al. 1997). Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß beim multiplen Myelom die osteolytischen Läsionen nur sehr selten ausheilen: unter den Patienten, die nach einer Chemotherapie eine Remission erreichen, kommt es nur bei einem Drittel der Patienten zu einer Regression von Osteolysen (Bataille 1995). Andererseits wird durch eine konventionell-dosierte Chemotherapie bei nur etwa 40% der Patienten eine Remission erreicht (Alexanian et al. 1994). Diese Daten zeigen, daß der Beginn einer Behandlung der Knochenresorption erst im fortgeschrittenen Zustand beim multiplen Myelom keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefert.

Beim multiplen Myelom stellt die exzessive Knochenresorption ein Phänomen dar, das bereits Jahre vor der radiologischen Manifestation und dem Auftreten klinischer Symptome, einsetzt. Eine exzessive Knochenresorption stellte sich als frühes Symptom der Malignität bei monoklonalen Gammopathien unklarer Signifikanz heraus (Bataille et al. 1996). Beim multiplen Myelom haben quantitative Knochenbiopsien eine vermehrte Anzahl von Osteoklasten und zudem eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten gezeigt (Bataille et al. 1991). Initial kann die Aktivität der Osteoblasten als Reaktion auf die Osteoklasten-Aktivierung ebenfalls ansteigen. Während des weiteren Verlaufs der Erkrankung findet jedoch eine Entkopplung („uncoupling“) der Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten statt (Bataille et al. 1991). Die Adhäsion von Myelomzellen an das Knochenmarkstroma induziert bei den letztgenannten Zellen die Freisetzung von Faktoren wie IL-6, IL-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor, die Osteoklasten aktivieren (Tricot 2000). Die Osteoklasten-

aktivierenden Faktoren induzieren bei Osteoblasten die Bildung von TRANCE, einem Zytokin, das zu einer Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzellen führt.

Die Produkte des Kollagenstoffwechsels ICTP, NTx und DPD spiegeln als biochemische Marker das Ausmaß der Knochenresorption wieder (Eriksen et al. 1993). Beim multiplen Myelom kann die Knochenresorption bereits erhöht sein, bevor eine radiologisch erkennbare Knochenmanifestation vorliegt. Andererseits ist die Aktivität der Knochenabbauprozesse nicht an die sonstige Krankheitsaktivität des multiplen Myeloms (z.B. Höhe des Paraproteins, Ausmaß der Knochenmarkinfiltration) gekoppelt und bestätigt die klinische Beobachtung, daß trotz des Erreichens der sonstigen Remissionskriterien ein Fortschreiten der Knochenbeteiligung auftreten kann (Thornton et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß parallel zu den Krankheitsstadien nach Durie & Salmon ein Anstieg des ICTP Spiegels im Serum zu verzeichnen ist, während dies bei NTx, DPD und Osteocalcin nicht der Fall ist. Im untersuchten Kollektiv fanden wir bei Myelompatienten ICTP-Spiegel, die gegenüber Individuen mit MGUS signifikant erhöht waren. Für NTx und DPD konnte kein signifikanter Unterschied zwischen MGUS und multiplem Myelom ermittelt werden. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals zwischen den Gruppen MGUS und Stadium I ein signifikanter Unterschied der ICTP-Werte ermittelt werden. In einer Publikation von Pecherstorfer et al. (Pecherstorfer et al. 1997) wurde bei drei Individuen mit MGUS, die im weiteren Verlauf in ein multiples Myelom im Stadium I übergingen, ein Anstieg der Pyridinium-Crosslinks beschrieben.

Wir fanden, daß ICTP einen signifikanten Prognosefaktor für die Überlebenszeit darstellt. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit zwei aktuellen Publikationen (Abildgaard et al. 1997, Fonseca et al. 2000). Unsere Ergebnisse zeigen darüber hinaus, daß NTx und DPD im Gegensatz zu ICTP keine Prognosefaktoren beim multiplen Myelom darstellen. In den hier vorgestellten Untersuchungen zeigte sich unter den Parametern der Knochenresorption, ICTP, NTx und DPD, daß ICTP die größte Aussagekraft sowohl für die Trennung zwischen MGUS und multiplem Myelom als auch für die Trennung der verschiedenen Myelomstadien besitzt sowie eine prognostische Relevanz für das Überleben aufweist. Die Überlegenheit des ICTP-Spiegels könnte teilweise durch die geringere Variabilität der Serumparameter der Knochenresorption gegenüber den Urinparametern mitbedingt sein (Woitge et al. 1999).

Zusätzlich zu den Befunden zur Stadienverteilung und prognostischen Wertigkeit, fand sich bei Myelompatienten eine Korrelation des ICTP-Spiegels mit den angiogenetisch wirksamen Zytokinen bFGF, VEGF, HGF und IL-6. Die Korrelation des Knochenabbauproduktes ICTP mit den angiogenetischen Faktoren erscheint insofern interessant, als es erste Hinweise gibt, daß HGF, VEGF und IL-6 nicht nur angiogenetisch wirksam sind, sondern auch an der Aktivierung der Knochenresorption beteiligt sind. Es wurde gezeigt, daß HGF von Myelomzellen exprimiert wird, und das sowohl freies als auch zellgebundenes HGF die Expression von Interleukin-11 induziert (Borset et al. 1996, Hjertner et al. 1999), das wiederum die Osteoklasten aktiviert und die Knochenneubildung hemmt (Girasole et al. 1994). In histologischen Knochenpräparaten von Mäusen, denen zuvor rekombinantes VEGF injiziert worden war, konnte eine gegenüber unbehandelten Mäusen gesteigerte Osteoklastendifferenzierung nachgewiesen werden (Niida et al. 1999). Die Spezifität dieses Mechanismus konnte durch die Hemmung der sowohl durch HGF als auch VEGF hervorgerufenen Osteoklastenaktivierung mittels monoklonaler Antikörper gezeigt werden.

Für ICTP konnte in der vorliegenden Untersuchung eine diagnostische Wertigkeit bei Personen mit MGUS bzw. multiplem Myelom gezeigt werden. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob darüber hinaus auch eine prädiktive Bedeutung in der Vorhersage eines Knochenereignisses besteht, eine Frage, die wir in einer großen prospektiven Studie der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom (Zentrale Durchführung der Knochenstoffwechselevaluation: Dr. Sezer, Leitung der Studie Prof. Freund & Dr. Sezer) analysieren. Beim multiplen Myelom könnte ICTP aufgrund der bisherigen Ergebnisse den am besten geeigneten Kandidaten zur Einschätzung des Ausmaßes der Knochenbeteiligung und zur Verlaufskontrolle der Erkrankung im Skelettsystem darstellen. Beim multiplen Myelom sollte daher einerseits der diagnostische Wert von ICTP im Vergleich zu bildgebenden Verfahren (Röntgen des Skeletts, MRT), andererseits die Relevanz der Veränderungen von ICTP unter der Therapie mit Zytostatika und Bisphosphonaten prospektiv evaluiert werden. Die Durchführung entsprechender Untersuchungen sind nun von uns im Rahmen mehrerer Studien der Deutschen Myelom Studiengruppe vorgesehen bzw. bereits initiiert worden.



## 5.9. Möglichkeiten der Reduktion der Knochenresorption beim multiplen Myelom

Bisphosphonate sind Pyrophosphat-Analoga, die ein C-Atom statt des Sauerstoff-Atoms enthalten. Wie Pyrophosphate werden Bisphosphonate während der Mineralisation in die Oberfläche der Matrix des Knochens eingebaut. Verglichen mit Pyrophosphaten werden sie aber nicht so leicht durch hydrolytische Enzyme der Osteoklasten gespalten (Fleisch 1998). Sie führen sowohl zu einer Reduktion der Anzahl an Osteoklasten als auch zu einer Hemmung der Osteoklasten-Aktivität (Krempien 1996, Possinger et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, daß Pamidronat und Zoledronat als Aminobisphosphonate die Freisetzung von IL-6, einem wichtigen Wachstumsfaktor für Myelomzellen, hemmen (Derenne et al. 1999). Weitere Daten zeigen, daß Bisphosphonate bei Myelomzellen *in vitro* Apoptose induzieren (Shipman et al. 1997, Aparicio et al. 1998) und *in vivo* einen anti-Myelom-Effekt erzielen können (Dhodapkar et al. 1998b). Der Wert einer begleitenden Behandlung mit Bisphosphonaten ist bei Patienten, die chemotherapiert werden, in mehreren randomisierten Studien demonstriert worden (Sezer et al. 1999c). In einer Studie erhielten 392 Patienten mit multiplen Myelom im Stadium III und mindestens einer Osteolyse zusätzlich zu einer Chemotherapie randomisiert entweder 90 mg Pamidronat i.v. monatlich oder Placebo (Berenson et al. 1996, Berenson et al. 1998). Nach 21 Monaten war die Anzahl der Skelett-Ereignisse (pathologische Frakturen, spinale Kompression, Notwendigkeit eines operativen Eingriffs oder der Bestrahlung des Skeletts) in der Pamidronat-Gruppe (1,3/Jahr) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (2,2/Jahr) signifikant verringert (Berenson et al. 1998). In einer anderen randomisierten Studie bei 350 Patienten mit neu diagnostiziertem, symptomatischen oder schnell fortschreitenden multiplen Myelom erhielten die Patienten Clodronat 2,4 g/Tag p.o. oder Placebo in Zusammenhang mit der Chemotherapie, die aus Melphalan und Prednisolon bestand (Lahtinen et al. 1992). Der Anteil der Patienten, die eine Progression der osteolytischen Läsionen aufwiesen, lag in der Placebo-Gruppe bei 24% und in der Clodronat-Gruppe bei 12% ( $P < 0.03$ ). Eine retrospektive Subgruppenanalyse der Ergebnisse dieser Studie zeigte, daß nicht nur Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium, sondern auch in einem frühen Stadium von der Bisphosphonattherapie profitierten (Laakso et al. 1994). Der relative Nutzen der Behandlung war sogar in einer Subgruppe von Patienten ohne Osteolysen zu Beginn der Behandlung am größten. In einer weiteren kürzlich veröffentlichten Phase III-Studie erhielten 536 Patienten mit multiplen Myelom entweder



täglich 1600 mg Clodronat p.o. oder Placebo zusätzlich zu einer Chemotherapie (McCloskey et al. 1998). Unter der Bisphosphonat-Behandlung traten signifikant seltener Frakturen auf. Eine interessante Studie bei Mammakarzinom deutet darauf hin, daß die frühzeitige Bisphosphonattherapie eine effektive Therapiestrategie darstellen könnte. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom und Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark reduzierte die adjuvante Gabe von Bisphosphonaten (1600 mg Clodronat p.o. täglich) die Inzidenz von Knochen- und viszerale Metastasen signifikant (Diel et al. 1998). Der Pathomechanismus dieser Beobachtung, die übrigens in einer anderen Studie mit adjuvanter Therapie des Mammakarzinoms mit Bisphosphonaten nicht reproduziert werden konnte (Saarto et al. 1999), bedarf weiterer Klärung. In diesem Zusammenhang ist der Befund, daß Aminobisphosphonate  $\gamma\delta$ T-Zellen stimulieren, bemerkenswert (Kunzmann et al. 2000). Solche Mechanismen, falls Sie beim Menschen für die Krankheitskontrolle relevant sein sollten, dürften ihre hauptsächliche Wirksamkeit in Frühstadien der Krankheit entfalten. Die Summe der Hinweise, daß eine frühzeitige Bisphosphonattherapie die Progression des multiplen Myeloms hemmen könnte, hat uns veranlaßt, die erste prospektiv randomisierte Studie einer Bisphosphonattherapie beim multiplen Myelom im Stadium I in Zusammenarbeit mit der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom zu initiieren. Primäres Zielkriterium dieser Studie ist das progressionsfreie Überleben im Stadium I. Dieses Zielkriterium ist deswegen wichtig, da die Patienten im Stadium I die beste Lebensqualität aufweisen und die Verlängerung dieses Stadiums für den Patienten einen realen Nutzen darstellen kann. Außerdem kann die Überlebenszeit nach Eintritt der Behandlungsbedürftigkeit beim multiplen Myelom, außer durch die Option der Hochdosistherapie, mit unterschiedlichen Therapieprotokollen im Vergleich zu Melphalan und Prednison kaum beeinflußt werden. Ferner wird diese Studie uns die Möglichkeit geben, einer Reihe von klinisch wie zellbiologisch interessanter Fragen erstmals nachzugehen.

### **5.10. Zytogenetische Veränderungen beim multiplen Myelom**

Die zytogenetischen Untersuchungen, die mit konventioneller Metaphasenanalyse sowie mit FISH-Sonden für 13q14 und 17p13.1 durchgeführt wurden, zeigten einen sehr deutlichen Einfluß der zytogenetischen Veränderungen auf die Überlebenszeit der Patienten mit multiplen Myelom. Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit einer zytogenetischen Aberration lag bei 10 Monaten, während die mediane Überlebenszeit in dem Kollektiv ohne zytogenetische Veränderungen noch nicht erreicht wurde. Der Unterschied war hochsignifikant.

Da beim multiplen Myelom Metaphasen rar sind, kommt der FISH-Technik eine große Bedeutung zu. Die 17p13-Deletion führt zu einer Fehlfunktion des Tumorsuppressorgens p53. Das p53-Protein ist multifunktionell und ist ein Regulator des Zellzyklus. Es ist in der Lage, die Progression des Zellzyklus zu stoppen, wenn DNA-Schäden im Genom der Zelle vorliegen. Die 13q14-Deletion führt zum Verlust eines Tumorsuppressorgens, des Retinoblastom-Tumorsuppressorgens. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen über die prognostische Relevanz der zytogenetischen Befunde beim multiplen Myelom stehen im Einklang mit den Daten kürzlich publizierter Studien (Königsberg et al. 2000).

Die weitere Analyse unserer Daten ergab, daß Myelompatienten mit einer zytogenetischen Veränderung signifikant höhere  $\beta$ 2-Mikroglobulinkonzentrationen im Serum sowie einen signifikant höheren Grad der Plasmazellinfiltration im Knochenmark aufwiesen. Beide Befunde deuten auf einen Wachstumsvorteil der zytogenetisch aberranten Myelomzellen hin. Auch die Angiogenese könnte durch die zytogenetischen Veränderungen beeinflusst werden: Als Maß der Angiogenese lag die mediane MVD bei den Patienten ohne eine zytogenetische Aberration bei 29,6 Kapillaren/mm<sup>2</sup> und in der Gruppe mit einer zytogenetischen Veränderungen bei 60,4 Kapillaren/mm<sup>2</sup>, dieser Unterschied erreichte jedoch nicht die statistische Signifikanz. Weitere Untersuchungen mit höherer Patientenzahl sind von uns vorgesehen.

In einer multizentrischen Phase III Studie der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom wird die Zytogenetik der Myelomzellen bei Patienten mit multiplen Myelom im Stadium I

durch die jährlich durchgeführten Knochenmarkpunktionen mit der FISH Technik longitudinal untersucht (Dr. Sezer & Frau Prof. Thiel, Tumorzytogenetik der Charité). Von der Frühphase der Erkrankung an beginnend wird diese Studie die zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen bis zur klinischen Progression der Erkrankung erstmals in einem großen Kollektiv von über 200 Myelompatienten longitudinal untersuchen können. Da die Patienten im Stadium I in einem Arm der Studie ohne Therapie beobachtet und in dem anderen Studienarm einer Bisphosphonattherapie zugeführt werden, wird es möglich sein, die zytogenetischen Veränderungen bei der klonalen Evolution der Krankheit ohne den Einfluß der Chemotherapie, die selbst chromosomale Aberrationen hervorrufen kann, zu analysieren.

#### **5.11. Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Differenzierung zwischen multiplem Myelom und MGUS**

Zur Differentialdiagnose zwischen MGUS und multiplem Myelom existieren Klassifikationssysteme, die auf einer Kombination von klinischen Kriterien basieren, wie z.B. dem Ausmaß der Knochenmarkinfiltration durch Plasmazellen, der Konzentration monoklonaler Immunglobuline im Serum oder dem Vorhandensein von Knochenläsionen. Die am häufigsten verwendeten Systeme sind die Klassifikationen nach Durie & Salmon, Kyle & Greipp sowie der British Columbia Cancer Agency. Diese Systeme kommen jedoch lediglich in 2/3 der Fälle zu einer identischen Diagnose bezüglich multiplem Myelom oder MGUS (Ong et al. 1995). Die Differentialdiagnose anhand der Kombination verschiedener klinischer Parameter ist daher mit einem gewissen Grad an Unsicherheit verbunden. Das Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob durchflußzytometrische Charakteristika von Plasmazellen unter Berücksichtigung immunphänotypischer Merkmale und DNA Analysen zur Differentialdiagnose zwischen einem multiplen Myelom und MGUS herangezogen werden können. Im Knochenmark von MGUS-Patienten kommen zwei verschiedene Plasmazellsubpopulationen vor. Eine davon ist phänotypisch identisch mit Plasmazellen gesunder Personen (CD19+/CD56-). Eine zweite Population zeigt die gleichen Merkmale wie Plasmazellen von Myelompatienten, d.h. CD19-/CD56+ oder CD19-/CD56-. In der vorliegenden Studie wiesen alle Personen mit MGUS, dagegen jedoch kein Patient mit einem Myelom einen Anteil von  $\geq 20\%$  phänotypisch normaler Plasmazellen unter allen Plasmazellen

im Knochenmark auf. Es wurde gezeigt, daß Myelomzellen durch Interaktion mit Knochenmarkstroma bei Prä-B-Lymphozyten Apoptose induzieren (Tsujimoto et al. 1996). Der Grund für die Abnahme des Anteils phänotypisch normaler Plasmazellen dürfte einerseits durch die Expansion klonaler Plasmazellen beim multiplen Myelom, andererseits aber auch durch die Apoptoseinduktion auf der Prä-B-Zell-Ebene bedingt sein.

Nach den Kriterien von Durie und Salmon ist die Differentialdiagnose MGUS oder multiples Myelom bei den Patienten, die eine Plasmazellinfiltration des Knochenmarks von  $\leq 30\%$ , einen Paraproteingradienten von  $\leq 3,5\text{g/dl}$  IgG bzw.  $\leq 2\text{g/dl}$  IgA und keine Osteolysen im Röntgen des Skelettsystems aufweisen, schwierig. In dieser „Grenzgruppe“ wurden in der vorliegenden Arbeit 2 Gruppen definiert: Gruppe 1 umfaßte Patienten, bei denen der MRT-Befund für ein multiples Myelom sprach oder Patienten, die innerhalb von 18 Monaten durch Progression die diagnostischen Kriterien eines multiplen Myeloms erfüllten und Gruppe 2 die übrigen Patienten. Die Gruppen 1 und 2 zeigten einen hochsignifikanten Unterschied in dem Anteil der immunphänotypisch normalen Plasmazellen an allen Plasmazellen im Knochenmark. Dagegen zeigten unter anderem  $\beta 2$ -Mikroglobulin, CRP sowie die Anzahl zirkulierender Plasmazellen im peripheren Blut in den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Bei einem Grenzwert von  $\geq 20\%$  phänotypisch normalen Plasmazellen von allen Plasmazellen im Knochenmark konnten im untersuchten Kollektiv die Gruppen 1 und 2 mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% differenziert werden. Sollten die zur Zeit laufenden Untersuchungen zeigen, daß eine frühzeitige therapeutische Intervention beim multiplen Myelom Vorteile bietet, käme der Differenzierung zwischen MGUS und multiplen Myelom eine noch höhere Bedeutung zu, als es heute bereits der Fall ist. Die Validierung dieser Daten an einem größeren Kollektiv mit längerer Beobachtungszeit ist vorgesehen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Hochdosischemotherapie stellt für Patienten unter 60 Jahren die Standardtherapie des multiplen Myeloms dar. Nach 600 Hochdosischemotherapiezyklen mit autologer peripherer Stammzelltransplantation wurden die Risikofaktoren für infektiöse Probleme analysiert. In der Multivarianzanalyse zeigten sich erstmals Grundkrankheit, Alter und Zahl der transplantierten Stammzellen/kg als unabhängige Einflußfaktoren für die Rate der dokumentierten Infektionen nach Hochdosischemotherapie (Sezer et al. 1999a, Sezer et al. 2000a, Sezer et al. 2000b). In einer weiteren Analyse zeigte sich erstmals, daß die Dauer der schweren Mukositis sowohl die Rate der Infektionen, als auch die therapieassoziierte Mortalität signifikant beeinflusst (Sezer et al. 2000e). Die meisten Infektionen wurden durch gram-positive Organismen ausgelöst. Bemerkenswert war der Befund, daß keine der üblicherweise empirisch zur antimikrobiellen Prophylaxe eingesetzten Medikamente mit einer Reduktion der Infektionsrate verbunden war. Diese Daten bilden eine solide Grundlage für zukünftige Entwicklungen zur Besserung der Verträglichkeit der Hochdosischemotherapie.

In der Behandlung des multiplen Myeloms wird heutzutage zusätzlich zu einer Optimierung der Standardtherapien nach neuen Therapieansätzen gesucht. In einer kürzlich veröffentlichten Studie stellten wir die prognostische Bedeutung der Angiogenese im Knochenmark für das Überleben von unbehandelten Patienten mit multiplem Myelom fest (Sezer et al. 2000h). Die mediane MVD wurde als Cut-off benutzt, um das Kollektiv in zwei Gruppen zu dichotomisieren. Die Gruppe der Patienten mit einer niedrigen MVD wies ein signifikant längeres krankheitsbezogenes Überleben auf, als Patienten mit einer hohen Angiogenese im Knochenmark. Weiterhin konnten wir erstmals zeigen, daß es beim multiplen Myelom nach effektiver Chemotherapie zu einem signifikanten Rückgang der Angiogenese im Knochenmark kommt (Sezer et al. 2000j, Sezer et al. 2001b).

Darüber hinaus fanden wir bei Myelom-Patienten signifikant erhöhte Serum bFGF-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der bFGF-Konzentration parallel zur Progression der Erkrankung vom Stadium I bis zum Stadium III (Sezer et al. 2000g). Eine effektive Chemotherapie ging mit signifikanten Reduktionen der Serum-Konzentrationen von drei angiogenetisch wirksamen Zytokinen

VEGF, bFGF und HGF einher. Bei Nicht-Ansprechern zeigte sich dagegen keine signifikante Veränderung der Zytokinkonzentration (Sezer et al. 2001a). Diese Untersuchungen demonstrieren eine gesteigerte Angiogenese beim multiplen Myelom und legen eine Interaktion von malignen mit endothelialen Zellen über eine parakrine Produktion von angiogenetisch wirksamen Faktoren nahe. Darüber hinaus weisen unsere Daten auf die besondere Bedeutung des angiogenetisch wirksamen Zytokins bFGF beim multiplen Myelom hin (Sezer et al. 2001a). Diese Daten sind insofern wichtig, als sie den Weg zur Entwicklung neuer Therapieansätze durch spezifische Inhibition der Zytokinexpression der Myelomzellen oder durch spezifische Blockierung der Zytokinrezeptoren der Endothelzellen zur Hemmung der Angiogenese bereiten.

Die Induktion der Knochenresorption stellt eines der wichtigsten Charakteristika von malignen Plasmazellen dar. Nur bei wenigen Patienten mit multiplem Myelom bleibt im Verlauf der Erkrankung die Entwicklung von osteolytischen Läsionen aus. Der Beginn einer Behandlung der Knochenresorption erst im fortgeschrittenen Zustand liefert keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Unter den Knochenstoffwechselfparametern eignet sich ICTP am besten zur Kontrolle der Progression. ICTP stellt auch einen signifikanten Prognosefaktor für die Überlebenszeit dar.

Die Hinweise, daß eine frühzeitige Bisphosphonattherapie die Progression des multiplen Myeloms hemmen könnte, hat uns veranlaßt, die erste prospektiv randomisierte Studie einer Bisphosphonattherapie beim multiplen Myelom im Stadium I in Zusammenarbeit mit der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom zu initiieren (Studienleitung Prof. Freund & Dr. Sezer). Primäres Zielkriterium dieser Studie ist das progressionsfreie Überleben im Stadium I. Dieses Zielkriterium ist deswegen wichtig, da einerseits Patienten im Stadium I die beste Lebensqualität aufweisen und andererseits die Überlebenszeit nach Eintritt der Behandlungsbedürftigkeit im Stadium II/III des multiplen Myeloms mit verschiedenen Standardtherapieprotokollen, außer durch die Hochdosistherapie, kaum beeinflußt werden kann. Ferner wird diese Studie uns die Möglichkeit geben, einer Reihe von klinisch wie zellbiologisch interessanter Fragen erstmals nachzugehen.

Die zytogenetischen Untersuchungen, die mit konventioneller Metaphasenanalyse sowie mit

FISH-Sonden für 13q14 und 17p13.1 durchgeführt wurden, zeigten einen sehr deutlichen Einfluß der zytogenetischen Veränderungen auf die Überlebenszeit der Patienten mit multiplem Myelom. Nach diesen Vorarbeiten werden wir in der oben genannten multizentrischen Phase III Studie der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom die zytogenetischen Veränderungen der Myelomzellen im Stadium I durch die jährlich vorgesehenen Untersuchungen mit der FISH-Technik analysieren. Von der Frühphase der Erkrankung an beginnend werden in dieser Studie die zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen bis zur klinischen Progression der Erkrankung erstmals in einem großen Kollektiv von über 200 Myelompatienten longitudinal untersucht. Da die Patienten im Stadium I in einem Arm der Studie ohne Therapie beobachtet und in dem anderen Studienarm einer Bisphosphonattherapie zugeführt werden, wird es möglich sein, die zytogenetischen Veränderungen bei der klonalen Evolution der Krankheit ohne den Einfluß der Chemotherapie, die selbst chromosomale Aberrationen hervorrufen kann, zu analysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde schließlich noch die Frage untersucht, ob die durchflußzytometrische DNA-Analyse und der Immunphänotyp der Plasmazellen zur Differenzierung zwischen MGUS und multiplem Myelom herangezogen werden können, eine Differenzierung, die bei einem Teil der Patienten Probleme bereitet. Es zeigte sich, daß der Anteil der phänotypisch normalen Plasmazellen unter allen Plasmazellen im Knochenmark mit der höchsten Sensitivität und Spezifität (jeweils 100%) die Differentialdiagnose erlaubt, und zwar unabhängig von dem Grad der Plasmazellinfiltration des Knochenmarks. Sollten die zur Zeit laufenden Untersuchungen zeigen, daß eine frühzeitige therapeutische Intervention beim multiplen Myelom Vorteile bietet, käme der Differenzierung zwischen MGUS und multiplem Myelom eine noch höhere Bedeutung zu als es heute bereits der Fall ist.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Abildgaard N, Bentzen SM, Nielsen JL, Heickendorff L. Serum markers of bone metabolism in multiple myeloma: prognostic value of the carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP). Nordic Myeloma Study Group (NMSG). *Br J Haematol* 1997; 96: 103-110.
- 2 Abildgaard N, Glerup H, Rungby J, Bendix-Hansen K, Kassem M, Brixen K, Heickendorff L, Nielsen JL, Eriksen EF. Biochemical markers of bone metabolism reflect osteoclastic and osteoblastic activity in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2000; 64: 121-129.
- 3 Acenero MJ, Gonzales JF, Gallego GM, Ballesteros PA. Vascular enumeration as a significant prognosticator for invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1684-1688.
- 4 Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, Mansouri T, Gidel C, Keating M, Giles F, Estrov Z, Barlogie B, Albitar M. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 94: 3717-3721.
- 5 Aguayo A, Kantarjian H, Manshoury T, Gidel C, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000a; 96: 2240-2245.
- 6 Aguayo A, O'Brien S, Keating M, Manshoury T, Gidel C, Barlogie B, Beran M, Koller C, Kantarjian H, Albitar M. Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000b; 96: 768-770.
- 7 Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, Stuckey WJ Jr, Wilson HE. Treatment of multiple myeloma: combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA* 1969; 208: 1680-1685.
- 8 Alexanian R, Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 1994; 330: 484-489.
- 9 Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A. In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia* 1998; 12: 220-229.
- 10 Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R. A prospective, randomized



trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 1996; 335: 91-97.

- 11 Baird A, Böhlen P. Fibroblast growth factors. In: Sporn MB, Roberts AB (eds). *Peptide growth factors and their receptors I*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1990: 369-418.
- 12 Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77: 956-964.
- 13 Barlogie B, Smith L, Alexanian R. Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med* 1984; 310: 1353-1356.
- 14 Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, Mattox S, Vesole D, Siegel D, Tricot G, Munshi N, Fassas A, Singhal S, Mehta J, Anaissie E, Dhodapkar D, Naucke S, Cromer J, Sawyer J, Epstein J, Spoon D, Ayers D, Cheson B, Crowley J. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 1999; 93: 55-65.
- 15 Bataille R, Chappard D, Marcelli C, Rossi JF, Dessauw P, Baldet P, Sany J, Alexandre C. Osteoblast stimulation in multiple myeloma lacking lytic bone lesions. *Br J Haematol* 1990; 76: 484-487.
- 16 Bataille R, Chappard D, Marcelli C, Dessauw P, Baldet P, Sany J, Alexandre C. The recruitment of new osteoblasts and osteoclasts is the earliest critical event in the pathogenesis of human multiple myeloma. *J Clin Invest* 1991; 88: 62-66.
- 17 Bataille R, Boccadoro M, Klein B, Durie B, Pileri A. C-reactive protein and  $\beta$ 2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood* 1992; 80: 733-737.
- 18 Bataille R. Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995; 9: 285-295.
- 19 Bataille R, Chappard D, Basle M. Quantifiable excess of bone resorption in monoclonal gammopathy is an early symptom of malignancy: A prospective study of 87 bone biopsies. *Blood* 1996; 11: 4762-4769.
- 20 Bataille R, Manolagas S, Berenson J. Pathogenesis and management of bone lesions in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11: 349-361.

- 21 Battagay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995; 73: 333-346.
- 22 Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 728-733.
- 23 Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S, Lipton A, Keller A, Ballester O, Kovacs MJ, Blacklock HA, Bell R, Simeone J, Reitsma DJ, Heffernan M, Seaman J, Knight RD. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. *N Engl J Med* 1996; 334: 488-493.
- 24 Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S, Lipton A, Keller A, Ballester O, Kovacs M, Blacklock H, Bell R, Simeone JF, Reitsma DJ, Heffernan M, Seaman J, Knight RD. Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. *J Clin Oncol* 1998; 16: 593-600.
- 25 Bertolini F, Paolucci M, Peccatori F, Cinieri S, Agazzi A, Ferrucci PF, Coccorocchio E, Goldhirsch A, Martinelli G. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1999; 106: 504-509.
- 26 Bettica P, Moro L, Robins SP, Taylor AK, Talbot J, Singer FR, Baylink DJ. Bone-resorption markers galactosyl hydroxylysine, pyridinium crosslinks, and hydroxyproline compared. *Clinical Chemistry* 1992; 38: 2313-2318.
- 27 Beyer J, Schwella N, Zingsem J, Strohscheer I, Schwaner I, Oettle H, Serke S, Huhn D, Siegert W. Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1328-1335.
- 28 Bilgrami S, Aslanzadeh J, Feingold JM, Bona RD, Clive J, Dorsky D, Edwards RL, Tutschka PJ. Cytomegalovirus viremia, viruria and disease after autologous peripheral blood stem cell transplantation: no need for surveillance. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 69-73.
- 29 Blade J, Samson D, Reece D, Apperley J, Bjorkstrand B, Gahrton G, Gertz M, Giralt S, Jagannath S, Vesole D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol* 1998; 102: 1115-1123.

- 30 Borset M, Lien E, Espevik T, Helseth E, Waage A, Sundan A. Concomitant expression of hepatocyte growth factor and the receptor c-Met in human myeloma cell lines. *J Biol Chem* 1996; 271: 24655-24661.
- 31 Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 251: 802-804.
- 32 Brattstrom D, Bergqvist M, Larsson A, Holmertz J, Hesselius P, Rosenberg L, Brodin O, Wagenius G. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera from non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Res* 1998; 18: 1123-1127.
- 33 Brindle NP. Growth factors in endothelial regeneration. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1162-1172.
- 34 Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Oliviero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffey A. Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992; 119: 629-641.
- 35 Carlson K, Ljunghall S, Simonsson B, Smedmyr B. Serum osteocalcin concentrations in patients with multiple myeloma – correlation with disease stage and survival. *J Intern Med* 1992; 231: 133-137.
- 36 Chang E, Boyd A, Nelson CC, Crowley D, Law T, Keough KM, Folkman J, Ezekowitz RA, Castle VP. Successful treatment of infantile hemangiomas with interferon-alpha-2b. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19: 237-244.
- 37 Chaudhary R, Bromley M, Clarke NW, Betts CD, Barnard RJ, Ryder WD, Kumar S. Prognostic relevance of micro-vessel density in cancer of the urinary bladder. *Anticancer Res* 1999; 19: 3479-3484.
- 38 Chronic Leukemia and Myeloma Task Force of the National Cancer Institute: Proposed guidelines for protocol studies. II. Plasma cell myeloma. *Cancer Chemother Rep* 1973; 4: 145-158.
- 39 Comenzo RL, Vosburgh E, Falk RH, Sancherawala V, Reisinger J, Dubrey S, Dember LM, Berk JL, Akpek G, LaValley M, O'hara C, Arkin CF, Wright DG, Skinner M. Dose-intensive melphalan with blood stem cell support for the treatment of AL amyloidosis: Survival and responses in 25 patients. *Blood* 1998; 91: 3662-3670.
- 40 Craft PS, Harris AL. Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis. *Ann Oncol* 1994; 5: 305-311.

- 41 D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; *91*: 4082-4085.
- 42 Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 2000; *95*: 2630-2636.
- 43 Deplanque G, Harris AL. Antiangiogenic agents: clinical trial design and therapies in development. *Eur J Cancer* 2000; *36*: 1713-1724.
- 44 Derenne S, Amiot M, Barille S, Collette M, Robillard N, Berthaud P, Harousseau JL, Bataille R. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *J Bone Miner Res* 1999; *14*: 2048-2056.
- 45 Desikan R, Barlogie B, Sawyer J, Ayers D, Tricot G, Badros A, Zangari M, Munshi NC, Anaissie E, Spoon D, Siegel D, Jagannath S, Vesole D, Epstein J, Shaughnessy J, Fassas A, Lim S, Roberson P, Crowley J. Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. *Blood* 2000; *95*: 4008-4010.
- 46 Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, Lacy M, Langford JK, Barlogie B, Sanderson RD. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood* 1998a; *91*: 2679-2688.
- 47 Dhodapkar MV, Singh J, Mehta J, Fassas A, Desikan KR, Perlman M, Munshi NC, Barlogie B. Anti-myeloma activity of pamidronate in vivo. *Br J Haematol* 1998b; *103*: 530-532.
- 48 Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* 1998; *339*: 357-363.
- 49 Dirix LY, Vermeulen PB, Hubens G, Benoy I, Martin M, De Pooter C, Van Oosterom AT. Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 1996; *7*: 843-848.
- 50 Dirix LY, Vermeulen PB, Pawinski A, Prove A, Benoy I, De Pooter C, Martin M, Van Oosterom AT. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. *Br J Cancer* 1997; *76*: 238-423.

- 51 Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36: 842-854.
- 52 Durie BGM. Staging and kinetics of multiple myeloma. *Semin Oncol* 1986; 13: 300-309.
- 53 Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Mineral Res* 1993; 8: 127-132.
- 54 Ezekowitz RA, Mulliken JB, Folkman J. Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy. *New Engl J Med* 1992; 326: 1456-1463.
- 55 Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Senger DR, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 1994; 180: 341-346.
- 56 Fiedler W, Graeven U, Ergun S, Verago S, Kilic N, Stockschrader M, Hossfeld DK. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 1997; 89: 1870-1875.
- 57 Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocrine Rev* 1998; 19: 80-100.
- 58 Folkman J, Klagsbrun M. Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature* 1987; 329: 671-672.
- 59 Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934.
- 60 Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995; 1: 27-31.
- 61 Folkman J. New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer* 1996; 14: 2534-2539.
- 62 Fonseca R, Trendle MC, Leong T, Kyle RA, Oken MM, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR. Prognostic value of serum markers of bone metabolism in untreated multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2000; 109: 24-29.
- 63 Foss HD, Araujo I, Demel G, Klotzbach H, Hummel M, Stein H. Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. *J Pathol* 1997; 183: 44-50.

- 64 Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* 1994; 368: 237-239.
- 65 Gallego GM, Acenero MJ, Sanz Ortega J, Aljama A. Vascular enumeration as a prognosticator for colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 2000; 36: 55-60.
- 66 Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, Barbareschi M, Boracchi P, Marubini E, Pozza F. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 454-466.
- 67 Gilbert C, Meisenberg B, Vredenburgh J, Ross M, Hussein A, Perfect J, Peters WP. Sequential prophylactic oral and empiric once-daily parenteral antibiotics for neutropenia and fever after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow support. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1005-1011.
- 68 Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93: 1516-1524.
- 69 Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (< 0.76 mm) malignant melanomas. *Am J Pathol* 1994; 145: 510-514.
- 70 Grant MB, Caballero S, Millard WJ. Inhibition of IGF-I and bFGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octreotide: a potential treatment for ocular neovascularization. *Regulatory Peptides* 1993; 48: 267-278.
- 71 Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J for the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1997. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 231-245.
- 72 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
- 73 Herwaldt LA, Hollis RJ, Boyken LD, Pfaller MA. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci isolated from immunocompromised patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; 13: 86-92.
- 74 Hjertner O, Torgersen ML, Seidel C, Hjorth-Hansen H, Waage A, Borset M, Sundan A. Hepatocyte growth factor (HGF) induces interleukin-11 secretion from osteoclasts:

- A possible role for HGF in myeloma associated osteolytic bone disease. *Blood* 1999; 94: 3383-3388.
- 75 Hjorth M, Hellquist L, Holmberg E, Magnusson B, Rodjer S, Westin J. Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I - a randomized study. *Eur J Haematol* 1993; 50: 95-102.
- 76 Holmberg LA, Boeckh M, Hooper H, Leisenring W, Rowley S, Heimfeld S, Press O, Maloney DG, McSweeney P, Corey L, Maziarz RT, Appelbaum FR, Bensinger W. Increased incidence of cytomegalovirus disease after autologous CD34-selected peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 1999; 94: 4029-4035.
- 77 Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.
- 78 Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Brown AE, Edwards JE, Feld R, Pizzo P, Rolston KV, Shenep JL, Young LS. 1997 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with unexplained fever. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 551-573.
- 79 Hussong JW, George MR, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 309-313.
- 80 Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 1994; 160: 194-202.
- 81 Karadag A, Oyajobi BO, Apperley JF, Russell RG, Croucher PI. Human myeloma cells promote the production of interleukin 6 by primary human osteoblasts. *Br J Haematol* 2000; 108: 383-390.
- 82 Kawano MM, Huang N, Harada H, Harada Y, Sakai A, Tanaka H, Iwato K, Kuramoto A. Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. *Blood* 1993; 82: 564-557.
- 83 Ketterer N, Espinouse D, Chomarat M, Dumontet C, Moullet I, Rieux C, Neidhardt-Berard EM, Bouafia F, Coiffier B, Salles G. Infections following peripheral blood progenitor cell transplantation for lymphoproliferative malignancies: etiology and potential risk factors. *Am J Med* 1999; 106: 191-197.



- 84 Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993; 362: 841-844.
- 85 Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 1414-1418.
- 86 Kolbe K, Domkin D, Derigs HG, Bhakdi S, Huber C, Aulitzky WE. Infectious complications during neutropenia subsequent to peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 143-147.
- 87 Königsberg R, Zojer N, Ackermann J, Kromer E, Kittler H, Fritz E, Kaufmann H, Nosslinger T, Riedl L, Gisslinger H, Jager U, Simonitsch I, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 804-812.
- 88 Krempien B. Experimental findings on osteoprotective potential of bisphosphonates against bone metastases and tumor-induced osteopathy: A pleading for an early and preventive administration in: Orr F and Singh G (eds.): *Bone Metastasis - Mechanisms and pathophysiology*. Springer, Heidelberg 1996.
- 89 Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Tony FW, Wilhelm M. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 2000; 96: 384-392.
- 90 Kyle RA. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clin Proc* 1975; 50: 29-40.
- 91 Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Baillière's Clin Haematol* 1995; 8: 761-781.
- 92 Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, et al. A trial of three regimens for primary amyloidosis: colchicine alone, melphalan and prednisone, and melphalan, prednisone, and colchicine. *N Engl J Med* 1997; 336: 1202-1207.
- 93 Laakso M, Lahtinen R, Virkkunen P, Elomaa I. Subgroup and cost-benefit analysis of the Finnish multicentre trial of clodronate in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994; 87: 725-729.
- 94 Lahtinen R, Laakso M, Palva I, Virkkunen P, Elomaa I. Randomised, placebo-controlled multicentre trial of clodronate in multiple myeloma. *Lancet* 1992; 340: 1049-1052.



- 95 Leibovich SJ, Polverini PJ, Fong TW, Harlow LA, Koch AE. Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; *91*: 4190-4194.
- 96 Link H, Maschmeyer G, Meyer P, Hiddemann W, Stille W, Helmerking M, Adam D for the Study Group of the Paul Ehrlich Society for Chemotherapy. Interventional antimicrobial therapy in febrile neutropenic patients. *Ann Hematol* 1994; *69*: 231-243.
- 97 Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; *64*: 327-336.
- 98 McCloskey EV, MacLennan IC, Drayson MT, Chapman C, Dunn J, Kanis JA. A randomized trial of the effect of clodronate on skeletal morbidity in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998; *100*: 317-325.
- 99 Menzel T, Rahman Z, Calleja E, White K, Wilson EL, Wieder R, Gabrilove J. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* 1996; *87*: 1056-1063.
- 100 Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994; *367*: 576-579.
- 101 Miyamoto T, Gondo H, Miyoshi Y, Shigematsu H, Minematsu T, Takenaka K, Tanimoto K, Horiuchi T, Asano Y, Inaba S, Minamishima Y, Niho Y. Early viral complications following CD34-selected autologous peripheral blood stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1998; *100*: 348-350.
- 102 Molica S, Vitelli G, Levato D, Gangolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1999; *107*: 605-610.
- 103 Montesano R. Regulation of angiogenesis in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; *22*: 504-515.
- 104 Mossad SB, Longworth DL, Goormastic M, Serkey JM, Keys TF, Bolwell BJ. Early infectious complications in autologous bone marrow transplantation: a review of 219 patients. *Bone Marrow Transplant* 1996; *18*: 265-271.
- 105 Munshi N, Wilson CS, Penn J, Epstein J, Singhal S, Hough A, Sanderson R, Desikan R, Siegel D, Mehta J, Barlogie B. Angiogenesis in newly diagnosed multiple myeloma: Poor prognosis with increased microvessel density in bone marrow biopsies. *Blood* 1998; *92 (Suppl 1)*: 98a.

- 106 Munshi N, Desikan R, Zangari M, Badros A, Chodimella U, Toor A, Cromer J, Terry J, Anaissie E, Barlogie B. Chemoangiotherapy with DT-PACE for previously treated multiple myeloma. *Blood* 1999; *94* (Suppl 1): 123a.
- 107 Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 2000; *473*: 161-164.
- 108 Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* 1999; *190*: 293-298.
- 109 Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994; *86*: 356-361.
- 110 O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; *79*: 315-328.
- 111 Offidani M, Corvatta L, Olivieri A, Rupoli S, Frayfer J, Mele A, Manso E, Montanari M, Centurioni R, Leoni P. Infectious complications after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation followed by G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1999; *24*: 1079-1087.
- 112 Oliver SJ, Banquerigo ML, Brahn E. Suppression of collagen-induced arthritis using an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, and a microtubule stabilizer, taxol. *Cell Immunol* 1994; *157*: 291-299.
- 113 Ong F, Hermans J, Noordijk EM, Kluin-Nelemans JC. Is the Durie and Salmon diagnostic classification system for plasma cell dyscrasias still the best choice? *Ann Hematol* 1995; *70*: 19-24.
- 114 Orfao A, Garcia-Sanz R, Lopez-Berges MC, Vidriales MB, Gonzales M, Caballero MD, San Miguel JF. A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique. *Cytometry* 1994; *17*: 332-339.

- 115 Padró T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, Buchner T, Berdel WE, Mesters RM. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 2637-2644.
- 116 Pecherstorfer M, Seibel MJ, Woitge HW, Horn E, Schuster J, Neuda J, Sagaster P, Kohn H, Bayer P, Thiebaud D, Ludwig H. Bone resorption in multiple myeloma and in monoclonal gammopathy of undetermined significance: quantification by urinary pyridinium cross-links of collagen. *Blood* 1997; 90: 3743-3750.
- 117 Perez-Atayde A, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 815-821.
- 118 Peterson DE. Research advances in oral mucositis. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 261-266.
- 119 Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Research* 1993; 53: 5822-5827.
- 120 Pluijm G, Lowik C, Papapoulos S. Tumour progression and angiogenesis in bone metastasis from breast cancer: new approaches to an old problem. *Cancer Treat Rev* 2000; 26: 11-27.
- 121 Possinger K, Flath B, Akrivakis K. Bisphosphonate im Behandlungskonzept des metastasierten Mammakarzinoms. *Geburtsh Frauenheilk* 1996; 56: M91-M94.
- 122 Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Ferrucci PF, Buffa R, Lambertenghi-Delilieri G, Pezzella F. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer* 1999; 81: 1398-1401.
- 123 Rajkumar SV, Fonseca R, Lacy MQ, Witzig TE, Lust JA, Greipp PR, Therneau TM, Kyle RA, Litzow MR, Gertz MA. Autologous stem cell transplantation for relapsed and primary refractory myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1999a; 23: 1267-1272.
- 124 Rajkumar SV, Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Greipp PR. Bone marrow angiogenesis in complete responders after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia* 1999b; 13: 469-472.
- 125 Rapoport AP, Miller-Watelet LF, Linder T et al. Analysis of factors that correlate with mucositis in recipients of autologous and allogeneic stem-cell transplants. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2446-2453.

- 126 Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989; 56: 345-355.
- 127 Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child JA, Smith GM, Jack AS, Morgan GJ. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterisation and correlation with stage disease. *Br J Haematol* 1997; 97: 46-55.
- 128 Ribatti D, Vacca A, Nico B, Fanelli M, Roncalli L, Dammaco F. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Eur J Haematol* 1996; 56: 45-53.
- 129 Risteli L, Risteli J. Biochemical markers of bone metabolism. *Annals of Medicine* 1993; 25: 385-393.
- 130 Ruescher TJ, Sodeifi A, Scrivani SJ et al. The impact of mucositis on alpha-hemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Cancer* 1998; 82: 2275-2281.
- 131 Saarto T, Blomqvist C, Virkkunen P, Elomaa I. No reduction of bone metastases with adjuvant clodronate treatment in node-positive breast cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18: 128a.
- 132 Sakuda H, Nakashima Y, Kuriyama S, Sueishi K. Media conditioned by smooth muscle cells cultured in a variety of hypoxic environments stimulates in vitro angiogenesis. A relationship to transforming growth factor-beta1. *Am J Pathol* 1992; 141: 1507-1516.
- 133 Salazar R, Solá C, Maroto P, Tabernero JM, Brunet J, Verger G, Valenti V, Cancelas JA, Ojeda B, Mendoza L, Rodriguez M, Montesinos J, López-López JJ. Infectious complications in 126 patients treated with high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 21: 27-33.
- 134 Salven P, Manpaa H, Orpana A, Alitalo K, Joensuu H. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 1997a; 3: 647-651.
- 135 Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H. High pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997b; 90: 3167-3172.

- 136 Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 144-146.
- 137 San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Moro MJ, Hernandez JM, Ortega F, Borrego D, Carnero M, Casanova F, Jimenez R, et al. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood* 1995a; 85: 448-455.
- 138 San-Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Orfao A. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1995b; 18: 179-184.
- 139 Schaar CG, Kaiser U, Snijder S, Ong F, Hermans J, Franck PFH, Kluin-Nelemans JC. Serum interleukin-6 has no discriminatory role in paraproteinaemia nor a prognostic role in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999; 107: 132-138.
- 140 Schmitz N, Linch DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, Demuynck HM, Link H, Zander A, Barge A. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 1996; 347: 353-357.
- 141 Schneider U, Van Lessen A, Huhn D, Serke S. Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD 45 antigen. *Br J Haematol* 1997; 97: 56-64.
- 142 Schott RJ, Morrow LA. Growth factors and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1155-1163.
- 143 Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 1987; 325: 257-259.
- 144 Seidel C, Borset M, Turesson I, Abeldgaard N, Sundan A, Waage A. Elevated serum concentrations of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. *Blood* 1998; 91: 806-812.
- 145 Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N, Waage A, Borset M. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood* 2000; 95: 388-392.
- 146 Seong C, Delasalle K, Hayes K, Weber D, Dimopoulos M, Swantkowski J, Huh Y, Glassman A, Champlin R, Alexanian R. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998; 101: 189-194.

- 147 Seropian S, Nadkarni R, Jillella AP, Salloum E, Burtness B, Hu GL, Zelterman D, Cooper DL. Neutropenic infections in 100 patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's disease treated with high-dose BEAM chemotherapy and peripheral blood progenitor cell transplant: out-patient treatment is a viable option. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 599-605.
- 148 Sezer O, Bauhuis C, Metzner B, Wattad M, Fuss H, Eucker J, Heit W, Schultze W, Illiger HJ, Possinger K. Multivariate analysis of factors influencing the rate of documented infections in 500 cycles high-dose chemotherapy with autologous peripheral stem cell transplantation. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie* 1999. *Onkologie* 1999a; 25 (*Suppl 1*): 134.
- 149 Sezer O, Gatz F, Peh A, Schmid P, Mergenthaler HG, Possinger K. Liposomal daunorubicin in multiple myeloma: Results of a phase I study of a modified VAD regimen using short-term infusion. 7th International Multiple Myeloma Workshop, Stockholm, 1999b: Abstract 68.
- 150 Sezer O, Schmid P, Mergenthaler H-G, Beinert T, Possinger K. Use of bisphosphonates in therapy and prophylaxis of cancer-induced bone diseases. *Onkologie* 1999c; 22: 400-404.
- 151 Sezer O, Schmid P, Schweigert M, Heider U, Eucker J, Harder H, Sinha P, Radtke H, Possinger K. Rapid reversal of nephrotic syndrome due to primary systemic AL amyloidosis after VAD and subsequent high-dose chemotherapy with autologous stem cell support. *Bone Marrow Transplant* 1999d; 23: 967-969.
- 152 Sezer O, Eucker J, Bauhuis C, Schweigert M, Lüftner D, Kalus U, Späth-Schwalbe E, Arnold R and Possinger K. Patients with malignant lymphoma experience a higher rate of documented infections than patients with breast cancer after high-dose chemotherapy with autologous peripheral stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2000a; 79: 627-630.
- 153 Sezer O, Eucker J, Fuss H, Bauhuis C, Kobert U, Heinzel W, Späth-Schwalbe E, Arnold R, Possinger K, Schultze W. Infectious complications during high dose therapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation. In: *High Dose Therapy and Transplantation of Haematopoietic Stem Cells*. Blackwell, 2000b: 90-93.
- 154 Sezer O, Eucker J, Heider U, Schweigert M, Schmid P, Possinger K. Therapeutic strategies in primary AL-amyloidosis. In: *High Dose Therapy and Transplantation of Haematopoietic Stem Cells*. Blackwell, 2000c: 21-26.

- 155 Sezer O, Eucker J, Jakob C, Possinger K. Diagnosis and treatment of AL amyloidosis. *Clin Nephrol* 2000d; 53: 417-423.
- 156 Sezer O, Eucker J, Metzner B, Wattad M, Fuss H, Bauhuis C, Heit W, Schultze W, Illiger HJ, Possinger K. Mucositis is associated with increased rate of documented infections and treatment-related mortality after high-dose therapy with autologous peripheral stem-cell transplantation. American Society of Clinical Oncology, 36th Annual Meeting, 2000. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000e; 19: 56a.
- 157 Sezer O, Eucker J, Schmid P, Possinger K. New therapeutic approaches in primary systemic AL amyloidosis. *Ann Hematol* 2000f; 79: 1-6.
- 158 Sezer O, Jakob C, Eucker J, Niemöller K, Schweigert M, Possinger K. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. American Society of Hematology, 42nd Annual Meeting, San Fransisco, 2000. *Blood* 2000g; 96 (Suppl): 366a.
- 159 Sezer O, Niemöller K, Eucker J, Jakob C, Kaufmann O, Zavrski I, Dietel M, Possinger K. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Haematol* 2000h; 79: 574-577.
- 160 Sezer O, Niemöller K, Jakob C, Langelotz C, Eucker J, Possinger K. Novel approaches to the treatment of primary amyloidosis. *Exp Opin Invest Drugs* 2000i; 9: 2343-2350.
- 161 Sezer O, Niemöller K, Schweigert M, Kaufmann O, Jakob C, Zavrski I, Eucker J, Possinger K. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in multiple myeloma and a significant decrease in microvessel density occurs in patients who achieve a remission after chemotherapy. American Society of Hematology, 42nd Annual Meeting, San Fransisco, 2000. *Blood* 2000j; 96 (Suppl): 363a.
- 162 Sezer O, Possinger K, Metzner B, Illiger H-J, Wattad M, Heit W, Fuss H, Schultze W. Optimal CD 34+ cell dose in autologous peripheral stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2000k; 18: 3319-3320.
- 163 Sezer O, Weis J, Watson M, Hjerstad MJ, Kopp M, Morris P and Velikova G on behalf of EORTC Quality of Life Study Group. Development of an EORTC module for quality-of-life assessment of cancer patients receiving high-dose chemotherapy with stem cell transplantation. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Graz, 2000. *Onkologie* 2000l; 23 (Suppl 7): 190.



- 164 Sezer O, Jakob C, Eucker J, Niemöller K, Gatz F, Wernecke KD, Possinger K. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2001a (in press).
- 165 Sezer O, Niemöller K, Kaufmann O, Eucker J, Jakob C, Schweigert M, Possinger K. Decrease of bone marrow angiogenesis in myeloma patients achieving a remission after chemotherapy. *Eur J Haematol* 2001b (in press).
- 166 Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RG, Croucher PI. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br J Haematol* 1997; 98: 665-672.
- 167 Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845.
- 168 Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeldis J, Barlogie B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999; 341: 1565-1571.
- 169 Sjak-Shie NN, Sultur GG, Said JW, Schrage M, Vescio RA, Berenson JR. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in multiple myeloma. *Blood* 1999; 94(Suppl 1): 305b.
- 170 Sone T, Miyake M, Takeda N, Fukunaga M. Urinary excretion of type I collagen crosslinked N-telopeptides in healthy Japanese adults: age- and sex-related changes and reference limits. *Bone* 1995; 17: 335-339.
- 171 Stead M, Brown J, Velikova G, Kaasa S, Wisloff F, Child A, Hippe E, Hjorth M, Sezer O and Selby P for the EORTC Study Group on Quality of Life. Development of an EORTC questionnaire module to be used in quality of life assessment for patients with multiple myeloma. *Brit J Haematol* 1999; 104: 605-611.
- 172 Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987; 327: 239-242.
- 173 Taniguchi T, Toi M, Inada K, Imazawa T, Yamamoto Y, Tominaga T. Serum concentrations of hepatocyte growth factor in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1031-1034.
- 174 Teicher BA, Holden SA, Ara G, Northey D. Response of the FSaII fibrosarcoma to antiangiogenic modulators plus cytotoxic agents. *Anticancer Res* 1993; 13: 2101-2106.



- 175 Thornton CO, Ballester O, Greenfield GB. Progression of bone disease in multiple myeloma patients treated with high dose therapy and autologous stem cell transplantation. *Blood* 1996; 88 (*Suppl.*); 481a.
- 176 Tricot G. New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Lancet* 2000; 355: 248-250.
- 177 Tsujimoto T, Lisukov IA, Huang N, Mahmoud MS, Kawano MM. Plasma cells induce apoptosis of pre-B cells by interacting with bone marrow stromal cells. *Blood* 1996; 87: 3375-3383.
- 178 Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994; 87: 503-508.
- 179 Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, Albini A, Bussolino F, Dammacco F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 1999a; 93: 3064-3073.
- 180 Vacca A, Ribatti D, Ruco L, Giacchetta F, Nico B, Quondamatteo F, Ria R, Iurlaro M, Dammacco F. Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer* 1999b; 79: 965-970.
- 181 Van Zaanen HCT, Vet RJWM, De Jong CM, Von dem Borne AEGK, Van Oers MHJ. A simple and sensitive method for determining plasma cell isotype and monoclonality in bone marrow using flowcytometry. *Br J Haematol* 1995; 91: 55-59.
- 182 Vermeulen PB, Salven P, Benoy I, Gasparini G, Dirix LY. Blood platelets and serum VEGF in cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 370-373.
- 183 Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S, Ushigome S. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 1992; 168: 257-262.
- 184 Weber DM, Gavino M, Delasalle K, Rankin K, Giralt S, Alexanian R. Thalidomide alone or with dexamethasone for multiple myeloma. *Blood* 1999; 94 (*Suppl 1*): 604a.
- 185 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
- 186 Weinstat-Saslow D, Steeg PS. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB J* 1994; 8: 401-407.

- 187 White CW, Wolf SJ, Korones DN, Sondheimer HM, Tosi MF, Yu A. Treatment of childhood angiomatous diseases with recombinant interferon alfa-2a. *J Pediatr* 1991; *118*: 59-66.
- 188 Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognise syndecan-1. *Br J Haematol* 1996; *94*: 318-323.
- 189 Witzig TE, Kimlinger TK, Ahmann GJ, Katzmann JA, Greipp PR. Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry. *Cytometry* 1996; *26*: 113-120.
- 190 Witzig T, Kimlinger T, Stenson M, Therneau T. Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; *31*: 167-175.
- 191 Woitge HW, Pecherstorfer M, Li Y, Keck AV, Horn E, Ziegler R, Seibel MJ. Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *J Bone Mineral Res* 1999; *14*: 792-801.

## Abkürzungen

AL	Amyloidose	primäre (Amyloid light-chain) Amyloidose
ALL		akute lymphatische Leukämie
AML		akute myeloische Leukämie
ANC		absolute Neutrophilenzahl
bFGF		basic fibroblast growth factor
β2-MG		β2-Mikroglobulin
DPD		Desoxypyridinolin
DPM		Dauer der parenteralen Morphintherapie
EORTC		European Organization for Research and Treatment of Cancer
FISH		Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HDCT		Hochdosischemotherapie
HGF		hepatocyte growth factor
ICTP		Carboxyterminales quervernetztes Typ I Kollagen Telozeptid
IL-6		Interleukin-6
MVD		Mikrogefäßdichte (microvessel density)
NTx		Aminoterninales Kollagen Typ I Telozeptid
PBSCT		periphere Blutstammzelltransplantation
PFS		progressionsfreie Überlebenszeit
S-Phase		Synthesephase
SWOG		Southwest Oncology Group
VEGF		vascular endothelial growth factor

## **Eidesstattliche Versicherung**

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kurt Possinger, Direktor der Medizinischen Klinik m.S. Onkologie und Hämatologie der Charité, für die wohlwollende Förderung der wissenschaftlichen Projekte und für die Unterstützung meiner gesamten klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit. Ich möchte an dieser Stelle den Kolleginnen und Kollegen meiner Arbeitsgruppe, Herrn Dr. Jan Eucker, Herrn Christian Jakob, Frau Ulrike Heider, Frau Kathrin Niemöller, Frau Ivana Zavrski und meinen Doktoranden Herrn Christoph Bauhuis, Frau Frauke Gatz, Frau Melanie Hartmann, Herrn Stefan Künstner, Frau Corinna Langelotz, Frau Anja Peh, Frau Francesca Regen und Frau Claudia Schille danken. Für die klinische Zusammenarbeit danke ich Kolleginnen und Kollegen unserer Klinik, insbesondere meinen Kollegen Herrn Dr. Jan Eucker und Herrn Dipl.-Med. Marcus Schweigert. Mein Dank für die interdisziplinäre Zusammenarbeit im Rahmen der hier dargestellten Projekte geht besonders an Herrn Dr. Olaf Kaufmann, Institut für Pathologie, Frau Prof. Dr. Gundula Thiel, Institut für Medizinische Genetik, Frau Dr. Brigitte Brux und Herrn PD Dr. Dr. Pranav Sinha, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité.

Berlin, im Dezember 2000

Dr. Orhan Sezer